T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Hakan GÜRKAN

TEKRARLAYAN GEBELİK KAYBI ÖYKÜSÜ OLAN HASTALARDA NLRP2, NLRP7 VE KHDC3L GEN VARYASYONLARI İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Netzat MOUSTAFA

EDİRNE – 2021

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Hakan GÜRKAN

TEKRARLAYAN GEBELİK KAYBI ÖYKÜSÜ OLAN HASTALARDA NLRP2, NLRP7 VE KHDC3L GEN VARYASYONLARI İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Netzat MOUSTAFA

Destekleyen Kurum: Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi

Tez No:

EDİRNE – 2021

TEŞEKKÜR

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirdiğim yüksek lisans eğitimim süresince bana emeklerini esirgemeyen danışman hocam sayın Doç. Dr. Hakan GÜRKAN başta olmak üzere, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Selma DEMİR'e, Dr. Öğr. Üyesi Emine İkbal ATLI'ya, Öğr. Gör. Engin ATLI'ya, Öğr. Gör. Yasemin ÖZEN'e, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Suat ERDOĞAN ile doktora öğrencileri Damla EKER, Çisem AKURUT ve laborant Can Muhammed ŞAHİN'e, bu çalışmayı destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (TÜBAP 2018-315) ve maddi, manevi desteğini benden esirgemeyen aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

TEKRARLAYAN GEBELİK KAYIPLARI ETİYOLOJİSİ 3

ÇEVRESEL NEDENLER 4

TROMBOFİLİK NEDENLER 4

GENETİK NEDENLER 5

KROMOZOMAL NEDENLER 6

ANATOMİK NEDENLER 6

ENDOKRİN NEDENLER 7

İMMÜNOLOJİK NEDENLER 8

TEKRARLAYAN GEBELİK KAYIPLARINDA NLPR2, NLRP7 VE KHDC3L GEN VARYASYONLARININ İLİŞKİSİ 9

GEREÇ VE YÖNTEMLER 14

BULGULAR 24

TARTIŞMA 30

SONUÇLAR 33

ÖZET 35

SUMMARY 36

KAYNAKLAR 37

TABLOLAR LİSTESİ 41

ÖZGEÇMİŞ 42

EKLER 43

SİMGE VE KISALTMALAR

ACMG : American College of Medical Genetics
BiHM : Biparental Hidatiform Mol
CASP1 : Caspase-1
CHM : Komplet Hidatiform Mol
CpG : Sitozin-Fosfat-Guanin
DM : Diabetes Mellitus
DNA : Deoxyribonucleic Acid
dbSNP : Single Nucleotide Polymorphism Database
EDTA : Ethylenediamine Tetra Acetic Acid
HEK293T : Human Embryonic Kidney 293 cells
HLA : Human Leucocyte Antigen
HM : Hidatiform Mol
HYDM : Hydatidiform Mole Recurrent
IGV : Integrative Genomics Viewer
IL-1b : İnterlökin 1 Beta
KHDC3L : KH domain containing 3 Like
LPD : Luteal Phase Defect
LPS : Lipopolisakkarit

LRR : Lösin açısından zengin tekrarlar
MTHFR : 5,10-methylenetetrahydrofolate Reductase
NALP : Nucleotide Binding Oligomerization Domain
NLRP : Nucleotide Binding Oligomerization Domain
NCBI : National Center for Biotechnology İnformation
NF-Kb : Nuclear Factor kappa B
NGS : Next Generation Sequencing
NK : Natural Killer
NLRP2 : NACHT, LRR and PYD containing protein 2
NLRP7 : NACHT, LRR and PYD containing protein 7
PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor-1
PCR : Polymerase Chain Reaction
PKOS : Polikistik Over Sendromu
RPL : Recurrent Pregnancy Loss
RSB : Resuspension Buffer
RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SNP : Single Nucleotid Polymorphism
TGK : Tekrarlayan Gebelik Kayıpları
THM : Tam Hidatiform Mol
TSH : Tiroid Uyarıcı Hormon
WHO : World Health Organization

GİRİŞ VE AMAÇ

Erken gebelik kayıpları, reprodüktif dönemin en sık karşılaşılan kadınsal problemlerinden birisidir ve hamileliğin sonlanmasına neden olan etkenlerin başında gelmektedir. Anne yaşının 18'den küçük ve 35'ten büyük olması, gebelik kaybı riskini arttırmakta ve literatürde 35 yaş üstü kadınlarda oosit yaşlanması nedeni ile anöploidi riskinin arttığı bildirilmiştir (1). Klinik olarak fark edilebilen gebelik kayıpları tüm gebeliklerin %15-20'sini kapsamaktadır (2). Tekrarlayan gebelik kaybı (TGK) genel olarak gebeliğin 20. haftasından önce, 500 gram (gr)'dan küçük, iki veya daha fazla ard arda yaşanan gebelik kaybı olarak tanımlanmaktadır. Sporadik gebelik kaybı insidansına göre, tekrarlayan gebelik kaybı insidansı 1/300'dür. Bununla birlikte, yapılan epidemiyolojik çalışmalar kadınların %1-2'sinin tekrarlayan gebelik kaybı yaşadığını göstermiştir. Gebelik kaybı insidansı bebek sahibi olmak isteyen çiftlerin yaşları, aile öyküsü ve genetik farktörler tarafından etkilenebilmektedir (3).

TGK tüm çiftlerin yaklaşık %1'ini etkilemektedir. TGK etiyolojisinde, anatomik nedenler, hormonal nedenler, immünolojik faktörler, enfeksiyonlar, çevresel faktörler, kromozom anormallikleri (sayısal ve/veya yapısal), koaogülasyon sistem bozuklukları, tek gen hastalıkları ve genetik olmayan faktörler sayılabilir (4).

Etiyolojik olarak birçok faktör bulunmakla beraber; bazı spontan abortus vakalarında etiyoloji çok açık iken, bazılarında ise belirsizdir. Gebelik kaybında belirli bir form olan hidatiform mol (HM), anormal gebelikte koryon villusun kistik dejenerasyonu ve trofoblastik hiperplazisi ile ifade edilmektedir (5).

Tam hidatiform mol (THM) genellikle sporadik ve androjenetiktir, ancak nadir görülen THM formları biparental olarak kalıtsaldır (BiHM) ve etkilenen kadınlarda TGK'ının nedeni olabilirler. BiHM'de *NLRP7* (NACHT, LRR and PYD protein 7 içeren alan) ve *KHDC3L* genlerinde patojenik varyasyonlar rapor edilmiştir. Açıklanamayan TGK'nın sebebinin %80'in üzerinde genetik nedenli olduğu ileri sürülmektedir (6). Tez çalışmamızın amacı Trakya Bölgesi'nde tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olan çiftlerin kadın eşlerinde NLRP2, NLRP7 ve KHDC3L genlerindeki olası varyasyonların araştırılmasıdır. Yapılacak olan tez çalışması sonucunda tekrarlayan gebelik kayıpları ile NLRP2, NLRP7 ve KHDC3L genleri arasında bir ilişkinin saptanması durumunda bu bilgi evrensel literatüre rapor edilecektir. Daha sonraki süreçte nedeni açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olan hastalarda ilişkili gen/genlerdeki varyasyonlar rutin olarak araştırılacaktır.

GENEL BİLGİLER

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) abortus tanımını gebeliğin ilk 20 haftası içinde, ağırlığı 500 gr' dan az fetüs ve eklerinin tamamının veya bir kısmının uterus boşluğuna atılması olarak yapmıştır.

Tekrarlayan gebelik kayıpları üç farklı ana grup içinde incelenmektedir;

1. Birincil Tekrarlayan Gebelik Kaybı: En az üç kez gebelik kaybı olan çiftin hiç canlı doğumunun olmamasıdır.
2. İkincil Tekrarlayan Gebelik Kaybı: En az üç kez gebelik kaybı olan çiftin gebelik kayıplarından en az bir tanesinin 20. gebelik haftası sonrasında gerçekleşmiş olmasıdır.
3. Tersiyer Tekrarlayan Gebelik Kaybı: Canlı doğum olan ve sonrasında en az üç kez gebelik kaybı olmasıdır.

TEKRARLAYAN GEBELİK KAYIPLARI ETİYOLOJİSİ

TGK'nın birden fazla nedeni olabilir. TGK nedenlerini Roger ve arkadaşları yedi başlık altında sınıflandırmışlardır; Trombofilik Nedenler, Genetik Nedenler, Kromozomal Nedenler, Anatomik Nedenler, Endokrin Nedenler, Çevresel Nedenler, İmmünolojik Nedenler (6).

ÇEVRESEL NEDENLER

Güncel veriler çevresel faktörlerin TGK'larına neden olduğu konusunda kesin kanıtlar olmadığını göstermektedir. Belirli bir besin eksikliğinin de TGK'na neden olduğuna dair kesit bir kanıt yoktur (7).

Fakat üç özel durum için; sigara, alkol ve kafein kullanımına özellikle dikkat çekilmiştir. Bu üç madde, kullanımı yaygın olduğundan ve etkileri göz önüne alındığında özel bir önem kazanmıştır. Maternal alkolizm (veya sarhoş edici miktarda alkol tüketimi), daha yüksek oranda spontan gebelik kaybı oranları ile tutarlı bir şekilde ilişkilendirilmiştir. Orta alkol alımını gebelik kaybıyla ilişkilendiren çalışmalar, ilk trimesterde haftada 3'ten fazla alkollü içecek tüketildiğinde risk oranlarında artış olduğunu göstermiştir. Sigara içimi ile vücuda alınan nikotinin güçlü vazokonstriktör etkisine bağlı olarak, uterus ve plasentada kan akışının azalması sonucunda kendiliğinden düşük riskinin artabileceği öngörülmektedir.

Bununla birlikte, sigara kullanımı ile gebelik kaybı arasındaki bağlantı halen tartışmalıdır. Kafeinle ilgili yapılan bir diğer çalışmada, kafein tüketimi hamilelik döneminde arttırıldığında, spontan düşük riskini 2 katına çıkardığı bildirilmiştir (8).

TROMBOFİLİK NEDENLER

Gebeliğin 3 aşamasında da önemli rol oynayan hemostatik sistem (ovulasyon, implantasyon ve plasentasyon) kan kaybının önlenmesi anlamına gelmektedir. Bir damar zedelendiğinde veya hasar gördüğünde ardışık bir seri sistem ile hemostaz sağlanmaktadır. Bu sistemler; damar spazmı, trombosit tıkaç oluşumu, kanın koagülasyonu sonucu kan pıhtısının oluşumu ve fibroz dokunun pıhtı içine doğru büyümesiyle damarda meydana gelen hasarın kalıcı olarak kapatılmasıdır (7).

Trombofili faktörü gebeliğin devamı için önemli bir etkendir. Fetus ve maternal dolaşımın bir parçası olan koryon villus ve maternal damarlarda oluşan pıhtı fetal beslenmede hasara neden olarak implantasyon başarısızlığına ve abortuslara neden olabilmektedir (8).

Trombofili kalıtsal olabildiği gibi yaşamın herhangi bir evresinde de meydana gelebilmektedir. Herediter trombofilinin görülme sıklığı popülasyonlar arasında farklılık gösterebilmektedir (9). Herediter trombofililer koagülasyon için gerekli bir kısım protein yapıdaki faktörlerin artışı ya da antikoagülan faktörlerinin bloke olması sonucu gelişmektedir. Faktör V Leiden, Protrombin 20210 G>A, MTHFR 677 C>T, MTHFR

1298 A>C, PAI-1 4G/4G, Beta Fibrinojen -455 G>A varyasyonlarının herediter trombofili etiyopatogenezinde rol oynadığı bildirilmiştir. İlgili genlerdeki varyasyonlara ek olarak hamilelik, kalp yetmezliği, kötü huylu tümörler ve orak hücre anemisi gibi rahatsızlıklar da trombofiliye neden olabilmektedir (10).

Herediter trombofili, gebelik kayıplarının etiyolojisinde önem arz etmektedir. Gebelik başladığında koagülasyon dengesi hiperkoagülasyon yönüne doğru ilerlemektedir. Bu durum bir takım maternal koruyucu faktörler ile sağlanmaktadır. Doğum gerçekleştikten kısa bir süre sonra pıhtılaşma öncüsü protein ve enzimler gebelik öncesi seviyelerine ulaşmaktadır. Kalıtımsal ya da sonradan edinilmiş trombofililer gebelikte hem anne hem de fetüs için tehlike oluşturmaktadır. Maternal damarlarda pıhtı birikmesi, beraberinde annenin yaşamsal tehlikesine, fetusun uterusa implantasyon başarısızlığına, gebelik zehirlenmesine ve ölü doğumlara neden olabilir (11).

GENETİK NEDENLER

Kromozom anomalisine sahip gebeliklerin yaklaşık %90'ı kaybedilirken, kromozom anomalisi olmayan gebeliklerin çoğu devam etmektedir (12). İlk trimester gebelik kayıplarının %50'sinde, ikinci trimester gebelik kayıplarının %30'unda ve ölü doğumların %3'ünde kromozomal anomalilerin varlığı bildirilmiştir (13) .

TGK olan hastaların düşük materyalinde kromozom anomali sıklığı yaklaşık %50-60'dır (13). TGK ile spontan düşükler arasında kromozom anomali sıklığı açısından anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Düşüklerde tespit edilen kromozomal anomalilerinin %90'ından fazlası sayısal (anöploidi, poliploidi) anomaliler, geri kalanlar ise translokasyon ve inversiyonları kapsayan yapısal anomaliler ve mozaisizmlerdir (14).

TGK'da en sık rastlanan kromozomal anomaliler otozomal trizomilerdir (Kromozom 13, 16, 18, 21 ve 22). Trizomi insidansı kadınlarda yaş ile birlikte artış göstermektedir. Trizomi 16, tüm trizomilerin %30'unu oluşturmakta ve gebelik kayıplarında en sık saptanan sayısal anomalidir (14). Trizomi 16'yı, monozomi X (45,X) ve poliploidiler takip etmektedir. Turner Sendromu (45,X) sitogenetik olarak anormal olan abortusların %20-25'ini oluşturur. Anormal fertilizasyona neden olan diğer genetik anomaliler arasında tetraploidi ve triploidi gibi anomaliler sayılabilir ve bu anomaliler yaşamla bağdaşmaz (15).

Genlere ait bazı mutasyonlar da TGK'na neden olabilecek bozukluklara yol

açabilir. TGK ile ilgisi kanıtlanan tek gen bozukluklarına en iyi örnek otozomal dominant kalıtım özelliği gösteren myotonik distrofidir (16). Fetüsü etkileyen ve düşüğe yol açan diğer otozomal dominant bozukluklar thanatoforik displazi ve tip II osteogenesis imperfecta gibi ölümcül iskelet displazileridir (17).

TGK öyküsü olan çiftlerin %2-5'inde ebeveynlerin birinde yapısal dengeli kromozom anomalisi (translokasyon) saptanmıştır. Bu oran normal popülasyonda %0.2'dir. Ebeveynlerde saptanan kromozomal anomaliler çoğunlukla translokasyon ve inversiyondur ve daha yüksek oranda da maternal kaynaklıdır. Paternal kromozom anomalisi saptanan çiftlerin canlı çocuk sahibi olma olasılıkları genel anlamda %50-70'tir. Ancak bu oran mevcut kromozomal bozuklukların yapısı ile yakından ilişkilidir (18).

KROMOZOMAL NEDENLER

Kromozomal anomaliler düşüklere neden olan en sık nedenlerden birisidir ve klinik düşüklerin yaklaşık %50'sini oluşturur. Onuncu gebelik haftasından önce kalıtsal olmayan yapısal ve sayısal kromozomal anomaliler ile meydana gelen abortlar gebelik kayıplarının yaklaşık %80'lik kısmını oluşturmaktadır (19).

Bu anomalilerin yaklaşık %56'sı trizomi, %20'si poliploidi, %18'i X kromozomu monozomisi ve %4'ü dengesiz translokasyonlardan oluşmaktadır. Klinik düşüklerde en sık saptanan trizomiler 21, 18, 16, 22, 15 ve 13'tür (20).Trizomili gebeliklerin çoğu düşükle sonuçlanabilir; istisnalar trizomi 21, 18 ve 13'ü içerir. Doğum sonrası hayatta kalma oranları trizomi 21'de %22, trizomi 18'de %5 ve trizomi 13'de %3'tür. Cinsiyet kromozomu trizomilerinde doğumdan sonra hayatta kalma oranı yukarda belirtilen trizomilere oranla daha yüksektir (21).

Literatürde klinik öncesi 1. trimester düşüklerin %70'nin bir kromozom anomaliğine bağlı olduğunu bildirmiştir. Kromozomal anomaliklerin sıklığının, ikinci ve üçüncü trimester gebelik kayıplarında yaklaşık %6 azaldığı rapor edilmiştir (22).

ANATOMİK NEDENLER

Anatomik anormallikler, TGK vakalarının %10-15'ini oluşturur ve genellikle endometriyumun kanlanmasını bozarak, anormal ve yetersiz yerleşime yol açan düşüklere neden olduğu düşünülür (23). Dolayısıyla, endometriyumun vasküler beslemesini kesebilecek anormalliklerin, TGK'nın potansiyel nedenleri olduğu

düşünülmektedir. Bunlar, doğuştan uterin anomalileri, intrauterin adezyonları ve uterin fibroidleri veya polipleri içerir. Her ne kadar ikinci trimester kayıpları veya erken doğumla daha kolay ilişkilendirilse de konjenital uterus anomalileri de TGK'da rol oynar (24).

Uterus septumu, etkilenen hastalar arasında %76 oranında spontan gebelik kaybı riski ile en yakından bağlantılı konjenital uterin anomalisidir. Unikornuat didelfis ve bikornuat uteri gibi diğer Müllerian anomalileri, TGK riskindeki daha küçük artışlarla ilişkilendirilmiştir (25).

Kavisli uterusun TGK etiyolojisindeki rolü belirsizdir. Bazen Asherman sendromuyla ilişkili olan intrauterin adezyonların varlığı, yerleşimi önemli ölçüde etkileyebilir ve erken gebelik kaybına neden olabilir. Beş cm'den büyük intramural fibroidler ve herhangi bir boyuttaki submukozal fibroidler TGK'ya neden olabilir (26). Uterin miyomlar bulundukları bölge ve büyüklüklerine göre gebeliği sonlandırabilecek üreme sorunlarına neden olabilir. Bu durum, anormal endometrial gelişim, anormal endokrin ortam ve kontraktil bozukluklar gibi durumlarda açıklanabilmektedir (27).

ENDOKRİN NEDENLER

TGK’nın yaklaşık %10’u endokrinolojik nedenlerle ilişkilendirilmiştir. Luteal faz defekti (LPD), polikistik over sendromu (PKOS), diabetes mellitus (DM), tiroid hastalığı ve hiperprolaktinemi, TGK’nın yaklaşık %17-20'sinde ortaya çıkan endokrinolojik bozukluklar arasındadır (28).

Geleneksel olarak, LPD'nin korpus luteum tarafından progesteronun yetersiz üretiminden ve uygun yerleştirme için yetersiz endometrial olgunlaşmadan kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Endometriyumun histolojik gelişiminde, menstrüel siklusun gününe kıyasla, 2 günden daha uzun bir kalıcı gecikme olduğunda teşhis edilir. Günümüzde LPD'nin TGK'daki gerçek rolü tartışmalıdır ve LPD teşhisi için endometrial biyopsiler nadir olarak belirtilmektedir. Bazı çalışmalar luteinize edici hormonda veya androjenlerde (her ikisi de PKOS ile ilişkili özelliklerde) TGK yaşayan hastalarda anormal yükselmeler olduğunu göstermiştir. Bu anormalliklerin oositin erken yaşlanmasına veya endometriyumun senkronize olmayan olgunlaşmasına neden olabileceğini düşünülmektedir (29).

Literatürde, TGK öyküsü olan kadınların en az %40'ında PKOS tanısı olduğu bildirilmiştir. İnsülin direnci ve PKOS (genellikle tip II diabetes mellitus) vakalarında sıklıkla görülen hiperinsülinemi (insülin sensitize edici ilaçla tedavi gören hastalarda

spontan gebelik kaybının azalmasıyla kanıtlandığı gibi) TGK'da rol oynayabilir. Kötü kontrol edilen tip 1 diabetes mellitus, spontan düşük riski artışı ile de ilişkilendirilmiştir. Tedavi edilmemiş hipotiroidizm, spontan düşük ve TGK ile net bir şekilde ilişkilendirilse de ötiroid hastalarda antitiroid antikorları ile TGK arasındaki bağlantı halen tartışmalıdır (30).

Antitiroid antikorları olan ötiroid kadınların, özellikle de doğurganlık tedavisine girenlerin, hamileliğin başlamasından kısa bir süre sonra klinik olarak hipotiroidi olma ihtimalinin bulunduğu rapor edilmiştir. Bu kadınlarda gebelik sonuçları erken (muhtemelen doğum öncesi) tiroid hormon replasmanı ile düzelebileceğinden, TGK'lı kadınlar arasında da benzer çalışılmalar yapılmaktadır (31).

Endokrin bozukluklarının değerlendirilmesi, tiroid uyarıcı hormon (TSH) seviyesinin ölçülmesini de içermelidir. Hastanın sunumuna dayanarak gösterilebilecek diğer testler, insülin direnci testi, yumurtalık rezerv testi, düzensiz adetlerin varlığında serum prolaktin, antitiroid antikor testi ve çok nadiren luteal endometrial biyopsileri içerir. PKOS varlığında ortaya çıkan TGK tedavisi için insülin duyarlılığını arttıran ajanlarla yapılan tedavi son zamanlarda popülerlik kazanmıştır (32).

İMMÜNOLOJİK NEDENLER

İmmünolojik açıdan bakıldığında, fetusun yaşamı annenin bağışıklık yanıtının supresyonuna bağlıdır. Sağlıklı bir gebelik için, embriyodaki paternal kaynaklı antijenlere karşı maternal immunolojik tarama gereklidir (33).

Yapılan taramalarda alınan yanıt ve bu yanıttaki anormallikler TGK'na yol açabilir. Paternal antijenlere karşı aşırı/dengesiz maternal immün cevap ve sitokin üretiminin TGK'na neden olabileceği bildirilmiştir (34).

TGK olan gebelerin periferik dolaşımlarında, endometriumlarında doğal öldürücü (NK) hücre miktarlarında ve aktivitelerinde farklılıklar olduğu görülmüştür. Maternal immün sistemin, paternal insan lökosit antijenlerini (Human leukocyte antigen, HLA) yabancı olarak algılaması ve ona karşı oluşturduğu allo-antikorlar fetusu kaplayarak koruyabilir. Koruyucu nitelikteki bu allo-antikorların yetersizliği TGK'na yol açabilir. TGK olan eşlerde HLA benzerliği ve buna bağlı olarak da allo-antikorların yetersizliği gösterilmiştir (35).

Gebelik immünolojisi ile ilgili bugün de tam olarak açıklanamamış, bilinmeyen nedenlerden dolayı gebeliğin reddi ve dolayısıyla da TGK meydana gelebilir. Eşler

arasındaki HLA uyumsuzluğu, maternal lökositoksisite ve maternal blokan antikor yetersizliği ile TGK arasında kanıta dayalı yeterli bilimsel veri bulunmamaktadır (36).

TEKRARLAYAN GEBELİK KAYIPLARINDA NLPR2, NLRP7 VE KHDC3L GEN VARYASYONLARININ İLİŞKİSİ

NLRP2 (NALP2)

NALP2 geni kromozom 19q13.42'de lokalizedir. *NALP2* gibi NALP proteinleri, bir N-terminal pirin alanı (PYD) ile karakterize edilir ve Toll benzeri reseptörler (TLR4) tarafından kaspaz-1'in (CASP1) aktivasyonunda rol oynar. NALP2, proinflamatuar kaspazları aktive eden protein komplekslerinde de rol oynayabilir (37).

Kuchmiy ve ark. (2016)'ları mikroarray veritabanı ve Reverse Transcription PCR (RT-PCR) analizleri ile fare ve insan yumurtalıklarında ve özellikle oositlerde seçici NLRP2 ekspresyonunu saptarken, erkek üreme sisteminde NLRP2 ifadesinin olmadığını bildirmiştir (38).

Endojen NALP2 ekspresyonunun inhibisyonu, Nuclear Factor kappa B (NF-kB)'nin lipopolisakkarit (LPS) aracılı indüksiyonunu arttırır. Mutasyon analizi, NALP2'nin pirin domaininin, çeşitli uyaranlar tarafından NF-kB indüksiyonunun inhibisyonuna aracı olduğunu, ancak diğer transkripsiyon faktörlerinin indüksiyonuna aracı olmadığını gösterdi. NALP2, CASP1'in aktivitesini arttırarak, NALP2 ve CASP1 ile birlikte İnterlökin 1 beta (IL-1b) sekresyonunu indükler. IL-1b indüksiyonu ayrıca NALP2 pirin domainine ihtiyaç duyar (38).

Peng ve ark. (2012)'ları, RNA interferansı kullanarak, farede NLRP2'nin susturulmasının oosit olgunlaşması üzerinde belirgin bir etkisi olmadığını, ancak partenogenetik aktivasyondan sonra 2 hücreli aşamada embriyonik arreste neden olduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada kontroller blastosist aşamasına ulaşmıştır. NLRP2'nin aşırı ekspresyonu ise, zigotların blastosist aşamasına gelmesine izin verirken, kontrollere kıyasla apoptotik blastomerlerin sayısını arttırmıştır (39).

Kuchmiy ve ark. (2016)'ları, *NLRP2* - / - farelerin, anormal fenotipler ve doğuştan gelen ve uyarlanabilir bağışıklık tepkileri olmadan yaşayabilir olduğunu saptadı. Olgun yetişkin *NLRP2* - / - farelerden (ancak genç olmayan *NLRP2* - / - fareler) elde edilen oositlerin, hatalı partenogenetik gelişim gösterdiği, *NLRP2* - / - dişilerin yaşlandıkça doğurganlık ve bir batında doğan yavruların sayısının azaldığı bildirilmiştir. Kuchmiy ve ark. (2016)'ları *NLRP2*'nin anne yaşına bağlı doğurganlığı seçici olarak kontrol ettiği

sonucuna varmıştır (38).

NLRP7 (NALP7)

Okada ve ark. (2004)'ları, NALP7'nin kromozom 19q13.4 de lokalize olduğunu ve 11 ekzon içerdiğini, ekzon 5 ve 9 için alternatif ekzonlar olduğunu bildirmiştir. Okada ve ark. (2004)'ları, RNA interferansı ile NALP7'nin susturulmasının bir karsinom hücre hattında büyümeyi azalttığını ve NALP7'nin hücre proliferasyonunda önemli bir rol oynayabileceğini rapor etmişlerdir (40).

NALP'ler, daha büyük CATERPILLER protein ailesi içinde bir alt aile oluşturan sitoplazmik proteinlerdir. NALP7 gibi çoğu kısa NALP, bir N-terminal pürin (MEFV) domaini (PYD), bir NACHT domaini, bir NACHT ile ilişkili domain (NAD) ve bir C-terminal lösin zengin tekrarlar içeren (LRR) bölgeye sahiptir. Uzun NALP, NALP1, ayrıca FIIND (find domain) ve CARD (caspase recruitment domain) bulmak için bir işlev içeren bir C-terminal uzantısına sahiptir. NALP'ler, inflammasomlar olarak adlandırılan multiprotein komplekslerine katılımları yoluyla proinflamatuar kaspazların (örneğin, CASP1) aktivasyonunda rol oynar (41).

Mahadevan ve ark. (2014)'ları, NLRP7'nin oositlerde ve erken insan embriyolarında yüksek oranda eksprese edildiğini ve ortolog olmadığını belirtmiştir. İnsan embriyonik böbrek hücreleri (HEK293T)'nde NLRP7'nin transfeksiyonu ve aşırı ekspresyonunun hem çekirdekte hem de sitoplazmada NLRP7 ekspresyonuyla sonuçlandığını rapor etmiştir (42).

TEKRARLAYAN HİDATİDİFORM MOL

Hidatidiform Mol, plasental villusun embriyo ve kistik dejenerasyon olmayan anormal bir insan gebeliğidir. Moglabey ve ark. (1999)'ları, ailesel hidatidiform mollerden sorumlu olan maternal resesif kromozom lokusunu 19q13.4 (HYDM1) olarak bildirmiştir (43). Murdoch ve ark.'ları (2006), mol hidatidiform aday bölgesini 0.65 Mb olarak ayrıntılı bir şekilde haritalandırarak, ailesel ve tekrarlayan hidatidiform mollü bireylerde maternal gen *NALP7*'de 5 mutasyon rapor etmiştir (44).

NALP7, bir dizi immünolojik ve inflamatuar yolu aktive eden bir pleiotropik sitokin olan IL1-beta'nın negatif bir düzenleyicisidir. IL1-beta, blastosistin implantasyonunu kolaylaştırdığı, proteaz ağını düzenlediği ve trofoblastın endometriyumu ne ölçüde istila edebileceğini kontrol ettiği preimplantasyon döneminde uterus ortamında bol miktarda bulunur. Üreme organlarında inflamatuar yolağın deregülasyonu veya NALP7

hatası olan kadınların uterusu, özellikle geç spontan düşükler, ölü doğumlar ve fetal gelişme hatası olan normal gebelikler olmak üzere konseptlerin fenotiplerindeki geniş değişkenliği açıklayacaktır (44).

Murdoch ve ark. (2006)'ları daha önce NALP7 geninde bir splicing bölgesi mutasyonu tanımladı ve ana tekrarlayan ve uzun serpiştirilmiş nükleer elementlerde, inaktif X kromozomundaki genlerde, 3 kanserle ilgili genlerde ve PEG3'de farklı şekilde metillenmiş bölgeyi çevreleyen sitozin-fosfat-guanin (CpG) bakımından zengin alanlarda normal postzigotik DNA metilasyon paternleri gösterdi. Djuric ve ark. (2006)'ları, postzigotik DNA metilasyonunun ve de novo metilasyonun NALP7 hatası olan ailesel hidatidiform mollerde normal olduğu ve bu dokulardaki anormal DNA metilasyonunun imprinted DMR'lerle sınırlı olduğu sonucuna varmıştır (45).

Deveault ve ark.(2009)'ları, sporadik ve ailesel hidatidiform molü olan hastalarda NLRP7 geninde 10 yeni sinonim olmayan varyantı / mutasyonu ve 1 trunkasyon mutasyonunu bildirmiştir. Hastalarda diploid biparental, diploid androgenetik, triploid ve tetraploid gebelikler görülmüştür. 3 hastada in vitro ve in vivo erken embriyo bölünme anormallikleri belgelenmiştir. Yazarlar, androgenetik mollerin kökeninde 2 vuruşlu bir mekanizma önermiştir. Bu mekanizma, haploid, diploid, triploid ve tetraploid blastomerleri ile kaotik mozaik anöploidilere yol açan değişken derecelerde erken embriyo bölünme anormalliklerinden oluşmaktadır. İmplantasyona ulaşan ve hayatta kalan embriyonik hücreler daha sonra maternal immün sistem tepkisi ile karşılaşabilir. Hastaların bozulmuş inflamatuar yanıtı nedeniyle, tam allogreft olan androgenetik hücreler büyüyebilir ve çoğalabilir (46).

Wang ve ark.(2009)'ları, doğrulanmış ailesel tekrarlayan hidatidiform mol teşhisi olan 20 aileden etkilenen bireylerde *NLRP7* genini analiz ettikleri çalışmalarında, ailelerin 17'sinde 16 farklı mutasyon bildirmiştir. Onyedi mutasyon pozitif aileden 14'ünde etkilenen üyelerin (sadece 1 aile akrabalık rapor etmesine rağmen) tanımlanan mutasyonlar için homozigot oldukları rapor edilmiştir. Wang ve ark.'ları, NALP7 geninin 693. kodonunda (R693W, R693P ve R693Q) 3 farklı mutasyon tanımlayarak, C-terminal LRR alanında bulunan 693 pozisyonunun, NLRP7 genindeki mutasyon için bir sıcak noktayı temsil ettiğini bildirmiştir (47).

Slim ve ark. (2009)'ları, NLRP7 genini analiz ettikleri tekrarlayan hidatidiform mol ve üreme kaybı olan, akraba olmayan 10 Hintli kadından 7'sinde R693P ve N913S mutasyonları için homozigotluk veya bileşik heterozigotluk bildirmişlerdir. Haplotip analizi, Hint popülasyonunda her iki mutasyon için de güçlü bir kurucu etki gösteren,

mutasyonların her birini taşıyan ortak bir haplotip göstermiştir. Bu durum, ebeveynleri arasında bilinen akrabalık olmamasına rağmen, hastaların 4'ünün homozigot olması gerçeğiyle de desteklenmiştir. Slim ve ark.'ları 1 çocuğu olan ve üreme problemi olmayan 1 probandın kardeşinin R693P ve N913S mutasyonları için bileşik heterozigot olduğunu, NLRP7'de 2 mutasyonu olan ve üreme sorunu olmayan üçüncü erkek hastayı bildirmiştir (48).

Andreasen ve ark.(2012)'ları, biparental diploid HM olan Danimarkalı bir kadında, NLRP7 genindeki bir splice bölgesi mutasyonu için homozigot olduğunu bildirmiştir (49).

Fallahian ve ark. (2013)'ları, Wang ve ark.(2009)'ları tarafından daha önce çalışılan bir kadının tam hidatidiform mol gebelik dokusunda gerçekleştirdikleri genetik analizde, NLRP7 geninde homozigot 14 bp duplikasyon saptadıklarını rapor etmişlerdir. Birincisi ve üçüncüsü diploid biparental HYDM'lerdi, ikincisi ise 1 baba ve 2 maternal allel içeren diginik triploid gebelikti. Fallahian ve ark.'ları, bu bulguların NLRP7'nin maternal baskıyı belirleme ve / veya sürdürmedeki rolü ile tutarlı olduğunu belirtmiştir (50).

NLRP7 VARYASYONLARININ TEKRARLAYAN GEBELİK KAYBI İLE OLASI İLİŞKİSİ

Huang ve ark.(2013)'ları, tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olan 143 Tayvanlı Han kadınında NLRP7 genindeki SNP'leri analiz ettikleri çalışmalarında, resesif bir modelde hastalar ve kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gösteren bir tek nükleotid polimorfizmi (rs269949) ($p = 0,0456$; olasılık oranı = 16,49 GG genotipi için) saptadıklarını bildirmiştir (51).

Aghajanova ve ark.'ları (2015), etiyolojisi bilinmeyen ortalama 4.7 düşük öyküsü olan 22'si Kafkas kökenli, 2'si Asya kökenli 24 kadında ve birincil açıklanamayan infertiliteye sahip 94 İsveçli veya Finlandiyalı kadında, NLRP7 geni varyasyonlarını araştırmış, ancak her iki grupta da hastalığa neden olan mutasyon saptamadıklarını rapor etmişlerdir (52).

KHDC3L

Memeli folikülü gelişimi sırasında, oositler, zigotik genom aktivasyonundan önce erken embriyo tarafından kullanılan önemli miktarda maternal RNA ve protein biriktirir. KHDC3L, erken embriyonik gelişimde rolü olduğu tahmin edilen bir

subkortikal maternal kompleksin (SCMC) bir bileşenidir (53).

Zhu ve ark.(2015)'ları, KHDC3L'yi insan fetal yumurtalıklarından klonladı. KHDC3L'nin fare homologu olan 346 amino asitli fare filia proteini ile % 41 amino asit özdeşliği paylaştığını bildirdiler. RT-PCR ile insan yumurtalıklarında KHDC3L ekspresyonunu saptanırken, incelenen diğer insana ait sekiz dokuda çok az ifade veya hiç ifade edilmediği rapor edildi. Konfokal mikroskopi ile, oositlerin ve erken embriyoların alt korteksinde NLRP5, KHDC3L, OOEP ve tam uzunlukta TLE6 kolokalize edilmiştir (53).

Genomik dizi analizi ile Pierre ve ark. (2007)'ları ECAT1 genini kromozom 6q13'de haritaladı. HEK293 hücrelerinin immünofloresan çalışmalarında Reddy ve ark. (2013)'ları, *KHDC3L*'nin juxta ve perinükleer bölgelerde NLRP7 (609661) ile ortak lokalize olduğunu göstermiştir (54).

Fallahian ve ark.(2013)'ları, Parry ve ark.'larının daha önce çalışmış olduğu dört komplet hidatidiform mol (CHM) gebelik öyküsü olan kadına ait dokunun genetik analizini gerçekleştirdikleri çalışmalarında, *KHDC3L* genindeki mutasyonlar için bileşik heterozigotluğu tanımlamış ve diginik triploid konseptiyle tutarlı olarak bir maternal olmayan ve iki maternal allel tespit ettikleri rapor etmişlerdir. Aynı zamanda *KHDC3L* mutasyonları için bileşik heterozigot olan probandın kız kardeşi iki CHM hamileliği geçirmişti; ikinci CHM'nin genotiplemesi, genoma hem maternal hem de paternal katkı sağlayan iki taraflı bir CHM olduğunu gösterdi. Fallahian ve ark.'ları, bu bulguların *KHDC3L*'nin maternal imprintingi oluşturmada ve / veya sürdürmedeki rolü ile tutarlı olduğunu bildirmiştir (50).

Reddy ve ark. (2013)'ları, HYDM2'li 3 akraba olmayan aileden 4 kadında *KHDC3L* geninde 2 farklı homozigot trunkasyon mutasyon tanımlamıştır. Bir hastadan alınan 5 farklı konseptin akış sitometrik (flow cytometric) analizi, hepsinin diploid biparental olduğunu göstermiştir. 2 hastadan alınan hematopoietik hücrelerin immünolojik çalışmaları, her iki C-terminal trunkasyon proteinin (güdük) normal hücre altı (subcellular) lokalizasyona sahip olduğunu ve *KHDC3L*'nin *NLRP7* ile ortak lokalize olduğunu göstermiştir (54).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Yüksek lisans tez çalışması Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen hasta grubundaki bireylere çalışma hakkındaki bilgileri içeren ve onayının alındığını belgeleyen "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu" imzalatıldı (EK-1).

Çalışmamız "Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu" tarafından, araştırmanın gerekçesi, amacı, yaklaşım ve yöntemleri incelendikten sonra 07.05.2018 tarihinde 08/06 karar numarası ve sayılı belge (TÜTF-BAEK 2018/172) ile onaylanmıştır (EK-2).

ÇALIŞMAMIZDA KULLANILAN CİHAZLAR, KİMYASAL MADDELER VE SARF MALZEMELER

Cihazlar

- Qiagen EZ1 Advanced XL-Otomatize DNA izolasyon cihazı (Almanya)
- Pipet seti (Eppendorf, Almanya)
- Nanodrop 2000C (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- NGS Illumina MiSeq (İllumina, ABD)
- Termal sayklır cihazı (Applied Biosystems, ABD)
- +4 ve -20 °C buzdolapları (Beko, Türkiye)
- Vorteks (İsolab, Türkiye), ultra saf su cihazı ve saf su (TKA, ABD)
- Santrifüj (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Biyogüvenlik kabini (Heraeus, Almanya) analizlerde farklı amaçlar için kullanıldı.
- Quantum ST4 VILBER LOURMAT jel görüntüleme cihazı (Vilber Lourmat, Fransa)
- Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen, ABD)

Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler

- DNA izolasyon kiti (Qiagen EZ1 DNA Blood 200 µl Kit, Hilden, Almanya)
- Distile su (Gibco Distilled Water DNase/RNase Free, 500 ml, Birleşik Krallık)
- İllumina Nextera XT Sample Preparation Kit (24,96) (ABD)
- Thermo Fisher Scientific™ Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase Kit (Norveç)
- Invitrogen Thermofisher Custom Primers (Almanya)
- 10 µl Racked Extended Length Filtered Vertex Tips, Natural, 10 Racks per Pack (Vertex Pipette Tips, ABD)
- 200 µl Racked Filtered Vertex Tips, Natural, Graduated, 10 Racks per Pack (Pipette Tips, ABD)

YÖNTEMLER

DNA İZOLASYONU

Çalışmaya dahil edilen hasta grubundaki her bir bireyden 2,5 cc periferik venöz kan örneği, 5 cc'lik EDTA'lı tüplere alındı ve DNA izolasyonu yapılana kadar +4 ºC'de saklandı. Periferik venöz kan örneklerinden genomik DNA, EZ1 DNA Blood 200 µl izolasyon kitleri (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak, EZ1 Advanced XL (Qiagen, Hilden, Almanya) nükleik asit izolasyon cihazı ile elde edildi. İzolasyon, kullanılan kitin protokolüne uygun olarak 200 µl kan örneği ile başlanıp son hacim 100 µl olacak şekilde yapıldı.

GENOMİK DNA'LARIN SPEKTROFOTOMETRİK ÖLÇÜMLERİ

Genomik DNA'ların konsantrasyon ve saflık değerleri NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, ABD) cihazı ile 260/280 nm dalga boylarında ölçüldü. 260/280 nm oranı 2.00'den büyük ve DNA konsantrasyonu 20 ng/µl'nin altında olan genomik DNA örnekleri çalışmaya dahil edilmedi. Dalga boyu oranı 1.5-2.0 ve konsantrasyon değeri 20-80 ng/µl arasında olan genomik DNA örnekleri çalışmaya dahil edildi. Konsantrasyon ve saflık kontrolünden geçen genomik DNA örnekleri çalışma zamanına kadar -20 ºC'de bekletildi.

PRİMER DİZAYNI

NLRP2, NLRP7 ve KHDC3L genlerine özgü primer (sentetik oligonükleotid) tasarımında Ensembl veri tabanından yararlanıldı (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). NLRP2, NLRP7 ve KHDC3L genlerine özgü primerler amplikonlar halinde tasarlandı (Invitrogen Thermofisher Custom Primers, Almanya) (Tablo 1).

Tablo 1. KHDC3L, NLRP2 ve NLRP7 genlerinin ekzonlara ayrılmış halde primer blast verileri

Primerler		Sekans (5'>3')	bp	Tm	GC%
KHDC3L	Forward Primer	TAGAGAACAGAGGCATCACTGGGCATG	27	66.2	52
	Reverse Primer	GCCAAAGTGTTCTCTGCTGGGGCTT	25	67.6	56
NLRP2 EX1F-2R	Forward Primer	TGTCCTGAGACCAGGCTCCACCACTA	26	68.2	58
	Reverse Primer	GCAGGGATGCTAAGTCCGGCATTTCTTTG	29	68	52
NLRP2 EX3F-5R	Forward Primer	TCTCACCAGAAAGGCACATAAACCTGGGA	29	67.4	48
	Reverse Primer	GGAATTCCTGACCCTAAGCCACAGTGCA	28	68.3	53
NLRP2 EX6F-9R	Forward Primer	GGTGTTGAGTTGTCTGATGGTGGTGCTAA	29	66.8	48
	Reverse Primer	ACCCAGGTCTTACCAGTTGTCATTAGC	27	64.4	48
NLRP2 EX10F-12R	Forward Primer	TGTCCCTCAGCTAGTGGTATGCTTCAC	27	66	52
	Reverse Primer	AGTAACAGCTTCATTTGTGAATGCTCTCACCT	32	66.5	40
NLRP7 EX1F-5R	Forward Primer	GTTCTTGGCACACAGGAAACTGTGGTTTC	29	66.7	48
	Reverse Primer	AGGCAAGGTGCAGTCAGGAATAGCATG	27	67	52
NLRP7 EX6F-8R	Forward Primer	CATGCTATTCCTGACTGCACCTTGCCT	27	67	52
	Reverse Primer	CCACCTATGGTTCCCTGGGTTTATGAGG	28	66	53.5
NLRP7 EX9F-10R	Forward Primer	ATGTCTGCTGTCACTAAAAACTCTGAGGA	29	64	41
	Reverse Primer	CCCTGAACTTCTTAGCAATACTTCCTCC	28	63	46

Bp: Primer Baz Uzunluğu; **Tm:** Sıcaklık; **GC%:** Guanin ve Sitozin oranı.

PRİMER OPTİMİZASYONU

- Primer optimizasyonunda Thermo Fisher Scientific™ Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase Kit'i kullanıldı
- Primer dizaynının ardından elde edilen veriler doğrultusunda uygun polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) şartları oluşturulup ilgili genlerin çoğaltılması sağlandı.
- Her bir ekzon için farklı PCR şartları oluşturuldu.

KHDC3L geni için uygun reaktif miktarları;

- Phusion Green 4 µl
- dH2O 10.8 µl
- DMSO 0.5 µl
- dNTP 0.5 µl
- DNA 1 µl
- Primerler (Forward+Reverse) 1.5+1.5 µl

Toplamda 20 µl ve aşağıdaki PCR şartları belirlendi (Tablo 2);

Tablo 2. KHDC3L PCR şartları

Sıcaklık °C	Süre	
98	2 dk	
98	10 sn	30 döngü
64	20 sn	
72	90 sn	
72	7 dk	
4	∞	

Dk: Dakika; **Sn:** Saniye.

NLRP2 EX3F-5R, NLRP2 EX6F-9R, NLRP2 EX10F-12R, NLRP7 EX1F-5R, NLRP7 EX9F-10R ekzonları için uygun reaktif miktarları;

- Phusion Taq 0.2 µl
- Phusion Green 4 µl
- dH2O 9.5 µl
- DMSO 0.5 µl

- dNTP 0.5 µl
- DNA 1.5 µl
- Primerler (Forward+Reverse) 1.5+1.5 µl

Toplamda 20 µl ve aşağıdaki PCR şartları belirlendi (Tablo 3);

Tablo 3. NLRP2 EX3F-5R, NLRP2 EX6F-9R, NLRP2 EX10F-12R, NLRP7 EX1F-5R, NLRP7 EX9F-10R için PCR Şartları

Sıcaklık °C	Süre	
98	2 dk	
98	10 sn	30 döngü
62	30 sn	
72	150 sn	
72	7 dk	
4	∞	

Dk: Dakika; **Sn:** Saniye.

NLRP2 EX1F-2R ekzonu için uygun reaktif miktarları;

- Phusion Taq 0.2 µl
- Phusion Green 4 µl
- dH2O 10.8 µl, DMSO 0.5 µl
- dNTP 0.5 µl
- DNA 1 µl
- Primerler (Forward+Reverse) 1.5+1.5 µl

Toplamda 20 µl ve aşağıdaki PCR şartları belirlendi (Tablo 4);

Tablo 4. NLRP2 EX1F-2R için PCR şartları

Sıcaklık °C	Süre	
98	2 dk	
98	10 sn	30 döngü
63	20 sn	
72	150 sn	
72	7 dk	
4	∞	

Dk: Dakika; **Sn:** Saniye.

NLRP7 EX6F-8R ekzonu için uygun reaktif miktarları;

- Fusion Taq 0.2 µl
- Fusion Green 4 µl
- dH2O 10.8 µl
- DMSO 0.5 µl
- dNTP 0.5 µl
- DNA 1 µl
- Primerler (Forward+Reverse) 1.5+1.5 µl

Toplamda 20 µl ve aşağıdaki PCR şartları belirlendi (Tablo 5);

Tablo 5. NLRP7 EX6F-8R ekzonu için PCR şartları

Sıcaklık °C	Süre	
98	2 dk	
98	10 sn	30 döngü
64	20 sn	
72	90 sn	
72	7 dk	
4	∞	

Dk: Dakika; **Sn:** Saniye.

JEL ELEKTROFOREZİ

- PCR aşaması tamamlanan örneklere kontrol amacıyla agaroz jel elektroforezi uygulandı (20 dakika süre ile 80 volt uygulandı).
- Biyogüvenlik kabininde (Heraeus, Almanya) jeldeki her bir kuyucuğa bir örnek olacak şekilde 2 µl PCR ürünü ve 2 µl etidyum bromür yükleme yapıldı.
- Çoğaltılması istenilen ekzon bölgeleri jel görünteleme cihazı Quantum ST4 VILBER LOURMAT (Vilber Lourmat, Fransa) ile analiz edildi.

YENİ NESİL SEKANSLAMA ÇALIŞMASI

Çalışma Protokolü

ILLUMINA PROPRIETARY (Nextera XT DNA Library Prep Reference Guide Document # 15027987v01) Protocol.

NGS Nextera XT DNA Library Prep Kit İçeriği

Birinci kutu içeriği;

- Amplication Tagment Mix (ATM)
- Tagment DNA Buffer (TD)
- Nextera PCR Master Mix (NPM)
- Resuspension Buffer (RSB)
- Library Normalization Additives 1
- Library Normalization Wash 1
- Hybridization Buffer (HT1)

İkinci kutu içeriği;

- Neutralize Tagment Buffer (NT)
- Library Normalization Beads 1
- Library Normalization Storage Buffer 1

Çalışılmak istenen bölgelere ve hasta sayısına göre havuz (pool) hazırlandı. Elde edilen PCR ürünleri karıştırıldıktan sonra Pürfikasyon ardından Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen, ABD) 198 µl Qubit dsDNA Buffer + 2 µl Florofor = 200 µl olacak şekilde ölçüm yapıldı.

0,5 ml tüpe karışımın 198 µl'si alınıp üzerine 2 µl PCR ürünü eklendi ve 0,2 ng/µl olacak şekilde ayarlanıp ölçüldü. Pürfikasyon başlangıç volümü 200 µl'dir. Pürfikasyon 50 µl Elution Buffer ile yapıldı. 10 µl ayrılır ve 90 µl dH2O eklenerek PCR ürünü dilüe edildi.

GENOMİK DNA TAGMENTASYONU

- Amplication Tagment Mix (ATM) ve Tagment DNA (TD) Buffer -20°C'den çıkartılıp buz üzerinde çözdürüldü, 5-6 kez alt üst edilerek mini santrifüj yapıldı.
- Neutralize Tagment Buffer (NT) kontrol edilip vorteksle karıştırılıp ve mini santrifüj yapıldı. 0,2 ml tüplere (pool sayısına göre, kaç pool olacaksa o kadar tüp çıkartıldı) ve tüplere 10 µl TD Buffer konuldu.
- Üzerine 5 µl PCR ürünü (0,2 ng/µl, toplam 1 ng/µl) eklendi. Tüpler 280 G'de 20°C'de 1 dk santrifüj ardından tüpler thermalcycler cihazına yerleştirilip ve program 55°C'de 5 dakika ve 10°C 'de süresiz olacak şekilde çalıştırıldı.
- Örnekler 10°C'ye ulaştığında üzerine 5 µl NT Buffer eklenip ve 5-6 kez

pipetaj yapılarak karıştırıldı.

- Thermalcycler cihazından çıkarıldıktan sonra örnekler 280 G'de 20°C'de 1 dk santrifüj edildi ve oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.

PCR AMPLİFİKASYONU

- Index 1 Primers (i7) ve Index Primers (i5) -20°C'den çıkartılarak oda sıcaklığında çözdürülüp mini santrifüj edildi.
- Örnek toplam hacmi 25 µl olan karışıma 15 µl Nextera PCR Master Mix (NPM) eklenip, üzerine 5 µl index 1 ve 5 µl index 2 primeri pipetaj yaparak eklendi.
- Tüpler 280 G'de 20°C'de 1 dakika soğutmalı santrifüjün ardından termal sayklır cihazına yerleştirilip aşağıdaki programla çalıştırıldı (Tablo 6);

Tablo 6. PCR Amplifikasyonu termal sayklır şartları

Sıcaklık	Süre	
72°C	3 dk	
95°C	30 sn	
95°C	10 sn	12 döngü
55°C	30 sn	
72°C	30 sn	
72°C	5 dk	
10°C	∞	

Dk: Dakika; **Sn:** Saniye

PCR TEMİZLEME AŞAMASI

- Resuspension buffer (RSB) ve AMPure çözdürülüp oda sıcaklığına gelmesi beklendikten sonra iyice karıştırıldı. %80 etilalkol çalışmada taze hazırlandı.
- PCR'dan çıkan tüpler mini santrifüj yapıldı. Tüplerin üzerine 90 µl AMPure XP Beads eklendi.
- 10 kez pipetaj yaparak karıştırılır ve 5 dk oda sıcaklığında beklenir. Manyetik plate üzerine alınıp 2 dk bekletildi ve dikkatlice süpernatant alınıp atıldı.

- Tüplerin üzerine 200 µl %80'lik etilalkol eklendi ve 30 sn bekledikten sonra dikkatlice süpernatant atıldı. Bu aşama bir kez daha tekrar edilip ardından tüpler 15 dk manyetik plate üzerinde kurumaya bırakıldı. Manyetik plate kullanılmadan tüplerin üzerine 52,5 µl RSB eklenip ve 9-10 kez pipetaj yapıldı.
- 2 dakika çalkalama ve 1800 rpm santrifüjden sonra 2 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- Tüpler tekrar manyetik plate üzerine alınıp ve 2 dk süpernatant belli oluncaya kadar bekletildi ve ardından supernatant tüplerden 40-50 µl olacak şekilde yeni tüplere aktarıldı.

ÖRNEK YÜKLEME

- Flow Cell solüsyondan çıkartıldıktan sonra distile su ile yıkanıp alkollü kağıtla temizlendi.
- Kartuş yüklemeden 1 saat önce çıkartılıp oda sıcaklığına gelmesi sağlandı ve daha sonra 25°C olan su banyosuna koyuldu.
- PCR temizleme yapılmış örneklerin konsantrasyonuna Qubit 4 Fluorometer cihazı kullanılarak bakıldı.
- Konsantrasyonları 4 nM geldikten sonra; 5 µl örnek + 5 µl 0,2 N NaOH (5 dk oda ısısı) 990 µl Hybridization Buffer (HT1) Buffer alındı.
- Üzerine 10 µl dilüe edilmiş örnekler pipetlendi. 220 µl HT1 + 380 µl örnek = 600 µl (12,5 pM) ve 7,5 µl PhiX (12,5 pM) eklendi. 96°C'de 2 dk bekletildi ve hemen buza alınıp, kartuşa yüklendi.

NGS VERİ ANALİZİ

NGS çalışması sonunda elde edilen veriler Genomize Bioinformatik Analiz Programı kullanılarak değerlendirildi. Saptanan varyasyonlar Broad Institute tarafından geliştirilen IGV (Integrative Genomics Viewer) programı kullanılarak görsel olarak, dbSNP, ClinVar ve HGMD gibi açık erişimli veri tabanlarında allel frekansları, klinik ile ilişkisi ve patojenitesi açısından değerlendirildi.

BULGULAR

VERİLERİN ANALİZİ

Çalışmaya Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi polikliniğine tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü ile başvuran 96 kadın hasta dahil edildi. Hastaların yaş ortalaması 27,4 (min:20, max:33)'tü. Çalışmaya dahil edilen tüm hastaların konvansiyonel sitogenetik yöntem ile yapılan karyotip analizleri 46,XX (normal), pyrosekans yöntemi ile çalışılmış olan FII, FV Leiden, MTHFR677, MTHFR1298, PAI'yi kapsayan trombofili analiz sonuçları normaldi.

Çalışmaya dahil edilen hastalarda NLRP2, NLRP7 ve KHDC3L genlerinde saptanmış olan varyasyonlar aşağıda belirtilmiştir (Tablo 7);

Tablo 7. NGS analizi sonucu saptanmış olan varyasyonlar

HASTA NO	KHDC3L	NLRP2	NLRP7
1	NORMAL	NORMAL	NORMAL
2	NORMAL	NORMAL	NORMAL
3	NORMAL	NORMAL	NORMAL

Tablo 7. NGS analizi sonucu saptanmış olan varyasyonlar (devamı)

HASTA NO	KHDC3L	NLRP2	NLRP7
4	NORMAL	NORMAL	NORMAL
5	NORMAL	NORMAL	NORMAL
6	NORMAL	NORMAL	NORMAL
7	NORMAL	NORMAL	NORMAL
8	NORMAL	NORMAL	NORMAL
9	NORMAL	NORMAL	NORMAL
10	NORMAL	c.1055T>G	NORMAL
11	NORMAL	NORMAL	NORMAL
12	NORMAL	NORMAL	NORMAL
13	NORMAL	c.1786C>T	NORMAL
14	NORMAL	NORMAL	NORMAL
15	NORMAL	c.1736C>T	NORMAL
16	NORMAL	NORMAL	NORMAL
17	NORMAL	NORMAL	NORMAL
18	NORMAL	NORMAL	NORMAL
19	NORMAL	NORMAL	NORMAL
20	NORMAL	c.1020C>A	NORMAL
21	NORMAL	NORMAL	NORMAL
22	NORMAL	NORMAL	NORMAL
23	NORMAL	NORMAL	NORMAL
24	NORMAL	NORMAL	NORMAL
25	NORMAL	NORMAL	NORMAL
26	NORMAL	NORMAL	c.2977C>A
27	NORMAL	c.147G>A	NORMAL
28	NORMAL	NORMAL	NORMAL
29	NORMAL	NORMAL	NORMAL
30	NORMAL	NORMAL	NORMAL
31	NORMAL	NORMAL	NORMAL
32	NORMAL	NORMAL	NORMAL
33	NORMAL	NORMAL	c.1725G>T
34	NORMAL	NORMAL	NORMAL
35	NORMAL	NORMAL	NORMAL
36	NORMAL	NORMAL	NORMAL
37	NORMAL	NORMAL	NORMAL

Tablo 7. NGS analizi sonucu saptanmış olan varyasyonlar (devamı)

HASTA NO	KHDC3L	NLRP2	NLRP7
38	NORMAL	NORMAL	NORMAL
39	NORMAL	NORMAL	c.1725G>T
40	NORMAL	NORMAL	NORMAL
41	NORMAL	NORMAL	NORMAL
42	NORMAL	NORMAL	NORMAL
43	NORMAL	NORMAL	NORMAL
44	c.*159A>G g.6860delC	NORMAL	NORMAL
45	NORMAL	NORMAL	NORMAL
46	NORMAL	NORMAL	NORMAL
47	NORMAL	NORMAL	NORMAL
48	NORMAL	NORMAL	NORMAL
49	NORMAL	NORMAL	NORMAL
50	NORMAL	NORMAL	NORMAL
51	NORMAL	NORMAL	NORMAL
52	NORMAL	NORMAL	NORMAL
53	NORMAL	NORMAL	NORMAL
54	NORMAL	NORMAL	NORMAL
55	NORMAL	NORMAL	NORMAL
56	NORMAL	NORMAL	NORMAL
57	NORMAL	NORMAL	NORMAL
58	NORMAL	NORMAL	NORMAL
59	NORMAL	NORMAL	NORMAL
60	NORMAL	NORMAL	NORMAL
61	NORMAL	NORMAL	NORMAL
62	NORMAL	NORMAL	NORMAL
63	NORMAL	NORMAL	NORMAL
64	NORMAL	NORMAL	NORMAL
65	NORMAL	NORMAL	NORMAL
66	NORMAL	NORMAL	NORMAL
67	NORMAL	NORMAL	NORMAL
68	NORMAL	NORMAL	NORMAL
69	NORMAL	NORMAL	NORMAL
70	NORMAL	NORMAL	NORMAL

Tablo 7. NGS analizi sonucu saptanmış olan varyasyonlar (devamı)

HASTA NO	KHDC3L	NLRP2	NLRP7
71	NORMAL	NORMAL	NORMAL
72	NORMAL	NORMAL	NORMAL
73	NORMAL	NORMAL	NORMAL
74	NORMAL	NORMAL	NORMAL
77	NORMAL	NORMAL	NORMAL
78	NORMAL	NORMAL	NORMAL
79	NORMAL	NORMAL	NORMAL
80	NORMAL	NORMAL	NORMAL
81	NORMAL	NORMAL	NORMAL
82	NORMAL	NORMAL	NORMAL
83	NORMAL	NORMAL	NORMAL
84	NORMAL	NORMAL	NORMAL
85	NORMAL	NORMAL	NORMAL
86	NORMAL	NORMAL	NORMAL
87	NORMAL	NORMAL	NORMAL
88	NORMAL	NORMAL	NORMAL
89	NORMAL	NORMAL	NORMAL
90	NORMAL	NORMAL	NORMAL
91	NORMAL	NORMAL	NORMAL
92	NORMAL	NORMAL	NORMAL
93	NORMAL	c.1786C>T	NORMAL
94	NORMAL	NORMAL	NORMAL
95	NORMAL	NORMAL	NORMAL
96	NORMAL	NORMAL	NORMAL

KHDC3L geni:

44 numaralı hastada rs1032302298 ve rs553706174 varyasyonları saptandı.

NLRP2 geni:

10 numaralı hastada rs147585490, 13 ve 93 numaralı hastalarda rs145361990, 15 numaralı hastada rs149897717, 20 numaralı hastada rs199475713, 27 numaralı hastada rs200815567 varyasyonları saptandı.

NLRP7 geni:

26 numaralı hastada rs1276342435, 33 ve 39 numaralı hastalarda rs73055288 varyasyonu saptandı.

Çalışmamızda saptanan varyasyonlar ve dbSNP veri tabanında rapor edilmiş olan allel frekansları aşağıda bildirilmiştir (Tablo 8).

Tablo 8. Varyasyonlar ve dbSNP veri tabanı allel frekansları

Gen	HGVS	dbSNP	dbSNP Allel Frekansı	Genotip
KHDC3L	NM_001017361.3:c.*159A>G	rs1032302298	G=0	A/G
KHDC3L	NG_031942.1:g.6860delC	rs553706174	delC=0.0002	-/C
NLRP2	NM_017852.5:c.1055T>G (NP_060322.1:p.Ile352Ser)	rs147585490	G=0.001	T/G
NLRP2	NM_017852.5:c.1786C>T (NP_060322.1:p.His596Tyr)	rs145361990	T=0.0044	C/T
NLRP2	NM_017852.5:c.1736C>T (NP_060322.1:p.Pro579Leu)	rs149897717	T=0.0018	C/T
NLRP2	NM_017852.5:c.1020C>A (NP_060322.1:p.Ala340=)	rs199475713	A=0.00003	C/A
NLRP2	NM_017852.5:c.147G>A (NP_060322.1:p.Lys49=)	rs200815567	A=0.0001	G/A
NLRP7	NM_001127255.1:c.1725G>T (NP_001120727.1:p.Leu575=)	rs73055288	T=0.036	G/T
NLRP7	NM_001127255.1:c.2977C>A NP_001120727.1:p.Leu993Ile	rs1276342435	T=0.000004	G/T

HGVS: Human Gnome Variation Society; **dbSNP**: Tek nükleotid polimorfizmi.

Çalışmamızda saptanan varyasyonların genotip ve allel frekansları aşağıda bildirilmiştir (Tablo 9).

Tablo 9. Çalışmamızda saptanan varyasyonların genotip ve allel frekansları

Varyasyonlar	Genotip Frekansı	Allel Frekansı
KHDC3L		
NM_001017361.3:c.*159A>G	AA= 95 (% 99) AG= 1 (% 1) GG= 0 (%)	A= 191 (% 99,5) G= 1 (% 0,005)
NG_031942.1:g.6860delC	CC= 95 (% 99) -/C= 1 (% 1) -/-= 0 (%)	C= 191 (% 99,5) delC= 1 (% 0,005)
NLRP2		
NM_017852.5:c.1055T>G	TT=0 95 (% 99) TG= 1 (% 1) GG= 0 (%)	T= 191 (% 99,5) G= 1 (% 0,005)
NM_017852.5:c.1786C>T	CC= 94 (% 98) CT= 2 (% 2) TT= 0 (%)	C= 190 (% 99) T= 2 (% 1)
NM_017852.5:c.1736C>T	CC= 95 (% 99) CT= 1 (% 1) TT= 0 (%)	C= 191 (% 99,5) T= 1 (% 0,005)
NM_017852.5:c.1020C>A	CC= 95 (% 99) CA= 1 (% 1) AA= 0 (%)	C= 191 (% 99,5) A= 1 (% 0,005)
NM_017852.5:c.147G>A	GG= 95 (% 99) GA= 1 (% 1) AA= 0 (%)	G= 191 (% 99,5) A= 1 (% 0,005)
NLRP7		
NM_001127255.1:c.1725G>T	GG= 94 (% 98) GT= 2 (% 2) TT= 0 (%)	G= 190 (% 99) T= 2 (% 1)
NM_001127255.1:c.2977C>A NP_001120727.1:p.Leu993Ile	GG= 95 (% 99) GT= 1 (% 1) TT= 0 (%)	G= 191 (% 99,5) T= 1 (% 0,005)

TARTIŞMA

Tekrarlayan gebelik kaybı (TGK), gebelik girişiminde bulunan üreme çağındaki çiftlerin % 5-15'ini etkileyen, çok faktörlü önemli bir üreme problemidir. Maternal ve fetal genetik faktörlerle birlikte maternal komorbiditeler, bu durumun etiyolojisinde rol oynamaktadır. Ancak kapsamlı araştırmalara rağmen, TGK'nın %40-50'sinde bir neden tespit edilememektedir. Önceki insan çalışmalarının yanı sıra üreme özelliği fenotipine sahip hayvan modelleri, yüksek etkili mutasyonlara sahip çok sayıda genin az sayıda vakaya katkıda bulunabileceğini öne sürerek, etkilenen hastaların kohortlarında makul aday genlerin değerlendirilmesini önermektedir (52).

Son zamanlarda NLRP7 genindeki heterozigot mutasyonların TGK ve sporadik HM gibi üreme başarısızlığı biçimleriyle ilişkili olabileceği rapor edilmiştir (55).

Literatürde NLRP2, NLRP7 ve KHDC3L varyasyonları ile TGK ilişkisini araştıran sınırlı sayıda çalışma bildirilmiştir. Çalışmamızda bu genlerdeki olası varyasyonların TGK ile ilişkisini araştırmak amacıyla, TGK öyküsü olan 96 kadının genomik DNA'sında NGS yöntemi ile mutasyonel analiz yapıldı.

TGK öyküsü olan 143 Tayvanlı Han kadınında NLRP7 genindeki tek nükleotid polimorfizm (single nucleotide polymorphism, SNP)'lerin analiz edildiği çalışmada,

resesif bir modelde hastalar ve kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gösteren bir SNP (rs269949) (p = 0,0456; olasılık oranı = 16,49 GG genotipi için) saptandığı bildirmiştir (51).

Etiyolojisi bilinmeyen, ortalama 4.7 düşük öyküsü olan 22'si Kafkas kökenli, 2'si Asya kökenli 24 kadında ve birincil açıklanamayan infertiliteye sahip 94 İsveçli veya Finlandiyalı kadında, NLRP7 geni varyasyonlarının araştırıldığı çalışmada, her iki grupta da hastalığa neden olan mutasyon saptamadığı rapor edilmiştir (52).

Çalışmamızda NLRP7 geninde dbSNP veri tabanında rapor edilmiş olan iki varyasyon saptadık. Bu varyasyonlardan birincisi rs73055288 numarası ile bildirilmiş olan heterozigot, NM_001127255.1:c.1725G>T (p.Leu575=) eş anlamlı (sinonim) varyasyonudur. Bu varyasyon ClinVar veri tabanında "olası benign" olarak rapor edilmiştir. NLRP7 geninde saptamış olduğumuz ikinci varyasyon, rs1276342435 numarası ile bildirilmiş olan heterozigot, NM_001127255.1:c.2977C>A (p.Leu993Ile) yanlış anlamlı (missense) varyasyonudur ve ClinVar veri tabanında rapor edilmemiştir. Bu varyasyonun global allel frekansı T= 0.000004 (1/251426, GnomAD_exome) olarak bildirilmiştir. American College of Medical Genetic 2015 (ACMG-2015) kriterlerine göre NM_001127255.1:c.2977C>A (p.Leu993Ile) varyasyonu "klinik önemi belirsiz (Uncertain Significance, VUS, PM2, PP2, BP4)" olarak değerlendirildi (56).

Huang ve ark.'ları, 143 TGK öyküsü olan hasta ve 149 sağlıklı kontrolü dahil etmiş oldukları vaka-kontrol çalışmalarında, NLRP2 geninde rs12768 SNP'nin nedeni açıklanamayan gebelik kaybı ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (51).

Çalışmamızda NLRP2 geninde dbSNP veri tabanında rapor edilmiş olan beş varyasyon saptadık. rs200815567, rs199475713, rs147585490, rs149897717, rs145361990 varyasyonlarını ClinVar veri tabanında bildirilmemişti. NLRP2 geninde saptamış olduğumuz üç yanlış anlamlı varyasyonun global allel frekansları 0.001, 0.0018, 0.0044 (GnomAD exome) olarak rapor edilmiştir.

Aghajanova ve ark.'ları, ortalama 4,7 (3–10 arasında değişen) gebelik kaybı öyküsü olan 24 kadın hastayı dahil etmiş oldukları çalışmalarında, *NLRP7, NLRP2* ve *KHDC3L* genlerinde mutasyonlara dair kanıt olmadığını bildirmiştir (52).

Nedeni açıklanamayan TGK öyküsü olan 29 kadın hasta ve normal fertiliteye sahip 205 kadının dahil edildiği çalışmada, araştırmacılar birbirleri ile akraba olmayan iki hastada KHDC3L geninde heterozigot iki farklı delesyon (NM_001017361, c.448-480del33, NM_001017361, c.448_516del69) saptadıklarını, bu iki delesyonu normal fertiliteye sahip 205 kadında saptamadıklarını (2/29 versus 0/205, Fisher exact test,

two-tailed P value = 0.015) bildirmiştir. Ayrıca araştırmacılar çalışma sonuçlarının, insan KHDC3L geninin homolog rekombinasyon onarımını, PARP1 aktivasyonunu ve genomik stabiliteyi düzenlemedeki rolüne dair kritik bilgiler sağladığını ve KHDC3L geninin yeni bir TGK risk geni olduğunu rapor etmiştir (57).

Çalışmamızda KHDC3L geninde dbSNP veri tabanında tanımlanmış olan rs1032302298 ve rs553706174 varyasyonlarını saptadık. NLRP2 3'UTR'de yer alan NM_001017361.3:c.*159A>G varyasyonu ClinVar veri tabanında rapor edilmemiş olup, global allel frekansı sıfırdı.

Çalışmamızda TGK öyküsü 96 hastada NLRP2, NLRP7 ve KHDC3L genlerinde açık erişimli veri tabanlarında rapor edilmiş ve/veya ACMG-2015 kriterlerine göre "patojenik, olası patojenik" olarak sınıflandırılan varyasyon saptamadık (56).

SONUÇLAR

Çalışmamıza Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi polikliniğine tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü ile başvuran 96 kadın hasta dahil edildi. Hastalarda *KHDC3L, NLRP2 ve NLRP7* genleri NGS yöntemi ile olası varyasyonlar açısından analiz edildi ve *KHDC3L* geninde iki, *NLRP2* geninde beş ve *NLRP7* geninde iki varyasyon saptandı. Bu varyasyonlardan sekizi ClinVar veri tabanında rapor edilmemişti.

Çalışmamızın sonuçları;

1- *NLRP7* geninde dbSNP veri tabanında rs73055288 numarası ile bildirilmiş olan heterozigot, NM_001127255.1:c.1725G>T (p.Leu575=) ve rs1276342435 numarası ile bildirilmiş olan heterozigot, NM_001127255.1:c.2977C>A (p.Leu993Ile) yanlış anlamlı varyasyonlarını saptadık. ACMG-2015 kriterlerine göre NM_001127255.1:c.2977C>A (p.Leu993Ile) varyasyonu “klinik önemi belirsiz” olarak değerlendirildi.
2- *NLRP2* geninde dbSNP veri tabanında rapor edilmiş rs200815567, rs199475713, rs147585490, rs149897717, rs145361990 varyasyonlarını saptadık. Bu varyasyonlar ClinVar veri tabanında rapor edilmemişti.

3- *KHDC3L* geninde dbSNP veri tabanında tanımlanmış olan rs1032302298 ve rs553706174 varyasyonlarını saptadık. *NLRP2* 3'UTR'de yer alan NM_001017361.3:c.*159A>G varyasyonu ClinVar veri tabanında rapor edilmemişti ve global allel frekansı sıfırdı.

Çalışmamızda *KHDC3L, NLRP2 ve NLRP7* genlerinde açık erişimli veri tabanlarında ve/veya ACMG-2015 kriterlerine göre "patojenik, olası patojenik varyasyon" saptanmadı. Çalışmamızda saptamış olduğumuz varyasyonlardan sekizinin global allel frekansının 0.004'den küçük (0.004-0.000004) olması dikkate alındığında, bu varyasyonların normal fertiliteye sahip kadınlarda da araştırılması literatüre önemli katkılar sağlayabilir

Literatürde TGK ile *KHDC3L, NLRP2 ve NLRP7* ilişkisini araştıran çalışma sonuçları ile çalışma sonuçlarımızın farklılık göstermesinin popülasyonlar arasındaki etnik farklılıklardan, hastaların çalışmaya dahil edilme kriterlerinin farklı olmasından ve kullanılan moleküler genetik yöntemlerin limitasyonlarından kaynaklanabileceği öngörüsündeyiz.

ÖZET

Tekrarlayan gebelik kaybı (TGK), üreme sağlığında önemli bir problemdir. TGK vakalarının yaklaşık %50'sinin nedeni açıklanamamıştır. TGK etiyolojisinde genetik temeli anlamak, teşhis ve prognoz için önemlidir. Bu nedenle çalışmamızda kadın üreme sisteminde önemli işlevleri olan *KHDC3L, NLRP2 ve NLRP7* genlerinin TGK ile ilişkisini araştırmayı amaçladık. Çalışmaya Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi polikliniğine TGK öyküsü ile başvuran 96 kadın hasta dahil edildi. Hastalarda *KHDC3L, NLRP2 ve NLRP7* genleri NGS yöntemi ile olası varyasyonlar açısından analiz edildi. *NLRP7* geninde rs73055288, rs1276342435, *NLRP2* geninde rs200815567, rs199475713, rs147585490, rs149897717, rs145361990 ve *KHDC3L* geninde rs1032302298, rs553706174 varyasyonlarını saptadık. Çalışmamızda açık erişimli veri tabanlarında ve/veya ACMG-2015 kriterlerine göre "patojenik, olası patojenik varyasyon" saptanmadı. Çalışmamızda saptamış olduğumuz sekiz varyasyonun global allel frekansı 0.004'den küçüktü (0.004-0.000004). Bu varyasyonların normal fertiliteye sahip kadınlarda da araştırılmasının literatüre önemli katkılar sağlayacağı öngörüsündeyiz.

Anahtar kelimeler: KHDC3L, NLRP2, NLRP7, Tekrarlayan gebelik kaybı.

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP OF *NLRP2, NLRP7* AND *KHDC3L* GENE VARIATIONS IN PATIENTS WITH RECURRENT PREGNANCY LOSS HISTORY

SUMMARY

Recurrent pregnancy loss (RPL) is an important problem in reproductive health. The cause of approximately 50% of RPL cases has not been explained. Understanding the genetic basis in the etiology of RPL is important for diagnosis and prognosis. Therefore, in our study, we aimed to investigate the relationship of KHDC3L, NLRP2 and NLRP7 genes with RPL, which have important functions in the female reproductive system. Ninety-six female patients who applied to the outpatient clinic of Trakya University Medical Faculty, Department of Medical Genetics, Genetic Diseases Diagnosis Center with a history of RPL were included in the study. KHDC3L, NLRP2 and NLRP7 genes were analyzed in terms of possible variations by NGS method. We detected rs73055288, rs1276342435 in the NLRP7 gene, rs200815567, rs199475713, rs147585490, rs149897717, rs145361990 in the NLRP2 gene and rs1032302298, rs553706174 in the KHDC3L gene. In our study, no "pathogenic, likely pathogenic variation" was found in open access databases and / or according to ACMG-2015 criteria. The global allele frequency of the eight variations we detected in our study was less than 0.004 (0.004-0.000004). We anticipate that investigating these variations in women with normal fertility will contribute significantly to the literature.

Keywords: KHDC3L, NLRP2, NLRP7, Recurrent Pregnancy Loss.

KAYNAKLAR

1. **Child TJ, Thomas J, Rees M, MacKenzie İZ.** A comparative study of surgical and medical procedures: 932 pregnancy terminations up to 63 days gestation. Hum Reprod 2001; 16:67-71.
2. **Van den Berg, M. M., van Maarle, M. C., van Wely, M., & Goddijn, M. (2012).** Genetics of early miscarriage. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 1822(12), 1951-1959.
3. **Carrington, B., Sacks, G., & Regan, L. (2005).** Recurrent miscarriage: pathophysiology and outcome. Current Opinion in Obstetrics and Gynecology, 17(6), 591-597.
4. **Rai R, Regan L.** Recurrent miscarriage. Lancet. 2006; 368:601–611.
5. **Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG.** International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. Hum Reprod. 2007; 22:1506–1512.
6. **Allison JL, Schust DJ.** Recurrent first trimester pregnancy loss: revised definitions and novel causes. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2009; 16:446–450.
7. **Armstrong B, McDonald A, Sloan M.** Cigarette, alcohol, and coffee consumption and spontaneous abortion. Am J Public Health 1992;82:85.
8. **Harlap S, Shiono PH.** Alcohol, smoking, and incidence of spontaneous abortions in the first and second trimester. Lancet 1980;173.
9. **Gardella J, Hill J.** Environmental toxins associated with recurrent pregnancy loss. Semin Reprod Med 2000;18:407.
10. **Kaare M, Götz A, Ulander VM, Ariansen S, Kaaja R, Suomalainen A, Aittomäki K.** Do mitochondrial mutations cause recurrent miscarriage? Mol Hum Reprod; May; 18, 15(5):295-300. Epub Mar; 2009.
11. **Matsuura T, Kobayashi T, Asahina T, Kanayama N, Terao T.** Is factor XII deficiency related to recurrent miscarriage? Semin Thromb Hemost 2001;27:115-120.
12. **Hassold T, Chiu D.** Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. Hum Genet 1985;70:11.
13. **Warburton D, Kline J, Stein Z, Strobino B.** Cytogenetic abnormalities in spontaneous abortions of recognized conceptions. In: Porter IH ed. Perinatal Genetics: Diagnosis and

Treatment. Academic Pres, New York 1986, pp.133.
14. **Dawood F, Farquharson R, Quenby S.** Recurrent miscarriage. Curr Obstet Gynaecol 2004;14:247-253.
15. **Exalto N, Christiansen O, Farquharson F, Jauniaux E.** Early pregnancy failure: a review. Eur Clinics Obstet Gynaecol 2007; 2:171-179.
16. **J., Simpson.** Causes of Fetal Wastage. Clin Obstet; 50:10-30.
17. **K., Byrne J and Ward.** Genetic factors in recurrent abortions. Clin Obstet Gynecol 1994;37:693-704.
18. **miscarriage., Porter T ve Scott J.** Evidence-based care of recurrent; 19:85-101.
19. **Ogasawara M, Aoki K, Okada S, and Suzumori K.** Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. Fertil.Steril. 73, 300–304; 2000.
20. **TN:, De Braekeleer M and Dao.** Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses, Hum Reprod; 5(5): p. 519-28; 1990.
21. **Rull K, Nagirnaja L and Laan M.** Genetics of recurrent miscarriage: challenges, current knowledge, futuredirections. March, Volume 3; 2012.
22. **O.B., Christiansen.** Afresh look atthecausesandtreatments of recurrentmiscarriage, especially its immunologicalaspects. Hum. Reprod. Update 2, 271–293; 1996.
23. **Guidline, Royal College of Obstetricians and Gynaecologists.** The management of reccurent miscarriage. RCOG; 17.
24. **Series, Acien P ve Acien M.** Evidence-based management of recurrent miscarriage. Surgical management. International Congress; 1266:335-334.
25. **Leible S, Munoz H, Walton R, et al.** Uterin arter blood flow velocity wave forms in pregnant women with mullerian duct anomaly. A biologic model for uteroplacental insufficiency. Am J Obstet Gynecol 1998; 178:1048.
26. **Propst A, Hill J.** Anatomic factors associated with recurrent pregnancy loss. Semin Reprod Med 2000; 18:341.
27. **Homer H, Li T, Cooke I.** The septate uterus. A review of management and reproductive outcome. Fertil Steril 2000; 73:1.
28. **Abalovich M, Gutierrez S, Alcaraz G, et al.** Overt and subclinic hypothyroidism complicating pregnancy. Thyroid 2002; 12:63.
29. **Gynecol, Coulam C and Stern J.** Endocrine factors associated with recurrent spontaneous abortion. Clin Obstet; 37:730-744.
30. **Series, Daya S.** Evidence-based management of recurrent miscarriage: optimal diagnostic protocal. International Congress; 1266:318-327.
31. **Miodovnik M, Skillman C, Holroyde J.** Elevated maternal glycohemoglobin in early pregnancy and spontaneous abortion among insulin-dependent diabetic women. Am J Obstet Gynecol 1985; 153:439-442.
32. **Okon M, Laird S, Tuckerman E, Li T.** Serum androgen levels in women who have recurrent miscarriages and their correlation with markers of endometrial function. Fertil Steril 1998; 69:682-690.
33. **RCOG, Royal College of Obstetricians and Gyneacologists.** The investigation and treatment of couples with recurrent miscarriage.; 17.
34. **Brocklehurst P, Hannah M, McDonald H.** Interventions for treating bacterial vaginosis in pregnancy. Cochrane Database Syst Rev 2000; 262.
35. **Laird S, Tukerman EM, Cork B, et al.** A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage. Hum Reprod Update 2003; 9:163-174.
36. **Pandey M, Rani R, Agrawal S.** An update in recurrent spontaneous abortion. Arch Gynecol Obstet 2005; 95-108., 272:.
37. **Agostini, L., Martinon, F., Burns, K., McDermott, M. F., Hawkins, P. N., Tschopp, J.** NALP3 forms an IL-1-beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. Immunity 20: 319-325, 2004.
38. **Kuchmiy, A. A., D'Hont, J., Hochepied, T., Lamkanfi, M.** NLRP2 controls age-associated maternal fertility. J. Exp. Med. 213: 2851-2860, 2016.
39. **Peng, H., Chang, B., Lu, C., Su, J., Wu, Y., Lv, P., Wang, Y., Liu, J., Zhang, B., Quan, F., Guo, Z., Zhang, Y.** Nlrp2, a maternal effect gene required for early embryonic development in

the mouse. PLoS One 7: e30344, 2012. Note: Electronic Article.
40. **Okada, K., Hirota, E., Mizutani, Y., Fujioka, T., Shuin, T., Miki, T., Nakamura, Y., Katagiri, T.** Oncogenic role of NALP7 in testicular seminomas. Cancer Sci. 95: 949-954, 2004.
41. **Tschopp, J., Martinon, F., Burns, K.** NALPs: a novel protein family involved in inflammation. Nature Rev. Molec. Cell Biol. 4: 95-104, 2003.
42. **Mahadevan, S., Wen, S., Wan, Y.-W., Peng, H.-H., Otta, S., Liu, Z., Iacovino, M., Mahen, E. M., Kyba, M., Sadikovic, B., Van den Veyver, I. B.** NLRP7 affects trophoblast lineage differentiation, binds to overexpressed YY1 and alters CpG methylation.
43. **Moglabey, Y. B., Kircheisen, R., Seoud, M., El Mogharbel, N., Van den Veyver, I., Slim, R.** Genetic mapping of a maternal locus responsible for familial hydatidiform moles. Hum. Molec. Genet. 8: 667-671, 1999.
44. **Murdoch, S., Djuric, U., Mazhar, B., Seoud, M., Khan, R., Kuick, R., Bagga, R., Kircheisen, R., Ao, A., Ratti, B., Hanash, S., Rouleau, G. A., Slim, R.** Mutations in NALP7 cause recurrent hydatidiform moles and reproductive wastage in humans. Nature Genet. 38: 300-302, 2006. .
45. **Djuric, U., El-Maarri, O., Lamb, B., Kuick, R., Seoud, M., Coullin, P., Oldenburg, J., Hanash, S., Slim, R.** Familial molar tissues due to mutations in the inflammatory gene, NALP7, have normal postzygotic DNA methylation. Hum. Genet. 120: 390-395, 2006.
46. **Deveault, C., Qian, J. H., Chebaro, W., Ao, A., Gilbert, L., Mehio, A., Khan, R., Tan, S. L., Wischmeijer, A., Coullin, P., Xie, X., Slim, R.** NLRP7 mutations in women with diploid androgenetic and triploid moles: a proposed mechanism for mole formation. Hum. Molec. Genet. 18: 888-897, 2009. Note: Erratum: Hum. Molec. Genet. 18: 4907 only, 2009.
47. **Wang, C. M., Dixon, P. H., Decordova, S., Hodges, M. D., Sebire, N. J., Ozalp, S., Fallahian, M., Sensi, A., Ashrafi, F., Repiska, V., Zhao, J., Xiang, Y., Savage, P. M., Seckl, M. J., Fisher, R. A.** Identification of 13 novel NLRP7 mutations in 20 families with recurrent hydatidiform mole; missense mutations cluster in the leucine-rich region. J. Med. Genet. 46: 569-575, 2009. .
48. **Slim, R., Bagga, R., Chebaro, W., Srinivasan, R., Agarwal, N.** A strong founder effect for two NLRP7 mutations in the Indian population: an intriguing observation. (Letter) Clin. Genet. 76: 292-295, 2009.
49. **Andreasen, L., Bolund, L., Niemann, I., Hansen, E. S., Sunde, L.** Mosaic moles and non-familial biparental moles are not caused by mutation in NLRP7, NLRP2 or C6orf221. Molec. Hum. Reprod. 18: 593-598, 2012.
50. **Fallahian, M., Sebire, N. J., Savage, P. M., Seckl, M. J., Fisher, R. A.** Mutations in NLRP7 and KHDC3L confer a complete hydatidiform mole phenotype on digynic triploid conceptions. Hum. Mutat. 34: 301-308, 2013.
51. **Huang, J.-Y., Su, M., Lin, S.-H., Kuo, P.-L.** A genetic association study of NLRP2 and NLRP7 genes in idiopathic recurrent miscarriage. Hum. Reprod. 28: 1127-1134, 2013.
52. **Aghajanova, L., Mahadevan, S., Altmae, S., Stravreus-Evers, A., Regan, L., Sebire, N., Dixon, P., Fisher, R. A., Van den Veyver, I. B.** No evidence for mutations in NLRP7, NLRP2 or KHDC3L in women with unexplained recurrent pregnancy loss or infertility. Hum. Reprod. 30: 232-238, 2015. .
53. **Zhu, K., Yan, L., Zhang, X., Lu, X., Wang, T., Yan, J., Liu, X., Qiao, J., Li, L.** Identification of a human subcortical maternal complex. Molec. Hum. Reprod. 21: 320-329, 2015.
54. **Nguyen, N. M. P., Zhang, L., Reddy, R., Dery, C., Arseneau, J., Cheung, A., Surti, U., Hoffner, L., Seoud, M., Zaatari, G., Bagga, R., Srinivasan, R., Coullin, P., Ao, A., Slim, R.** Comprehensive genotype-phenotype correlations between NLRP7 mutations and the balance between embryonic tissue differentiation and trophoblastic proliferation. J. Med. Genet. 51: 623-634, 2014. .
55. **Messaed C, ChebaroW, Di Roberto RB, Rittore C, Cheung A, Arseneau J, Schneider A, ChenMF, Bernishke K, SurtiUet al.** NLRP7in the spectrum of reproductive wastage: rare non-synonymous variants confer genetic susceptibility to recurrent reproductive wastage. J Med Genet 2011; 48:540–548.
56. **Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL ve Committee., ACMG Laboratory Quality**

Assurance. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. 2015 May;17(5):405-24.
57. **Weidao Zhang, Zhongliang Chen, Dengfeng Zhang , Bo Zhao , Lu Liu , Zhengyuan Xie , Yonggang Yao, Ping Zheng.** KHDC3L mutation causes recurrent pregnancy loss by inducing genomic instability of human early embryonic cells. PLoS Biol. 2019 Oct 14;17(10):e3000468. doi: 10.1371.

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. KHDC3L, NLRP2 ve NLRP7 genlerinin ekzonlara ayrılmış halde primer blast verileri.....**17**

Tablo 2. KHDC3L PCR şartları **18**

Tablo 3. NLRP2 EX3F-5R, NLRP2 EX6F-9R, NLRP2 EX10F-12R, NLRP7 EX1F-5R, NLRP7 EX9F-10R için PCR Şartları **19**

Tablo 4. NLRP2 EX1F-2R için PCR şartları **19**

Tablo 5. NLRP7 EX6F-8R ekzonu için PCR şartları **20**

Tablo 6. PCR Amplifikasyonu termal sayklır şartları. **22**

Tablo 7. NGS analizi sonucu saptanmış olan varyasyonlar **24**

Tablo 8. Varyasyonlar ve dbSNP veri tabanı allel frekansları…..……**28**

Tablo 9. Çalışmamızda saptanan varyasyonların genotip ve allel frekansları……..**29**

ÖZGEÇMİŞ

11.03.1989'da Gümülcine/Yunanistan'da doğdum. İlköğrenimi Gümülcine Mastanlı Azınlık İlkokulu'nda tamamladım. 2006 yılında Gümülcine Celal Bayar Azınlık Ortaokul-Lisesi'nden mezun oldum. 2007 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandım. 2015 yıllında lisans eğitimimi ve 2016 yılında askerlik görevimi Yunanistan'da tamamladım. 2017 Ocak ayında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladım.

EKLER

EK-1

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bir araştırma projesine davet edilmektesiniz. Bu araştırmanın yürütülmesi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun 07.05.2018 tarih ve 08/06 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Araştırmaya katılmaya karar vermeden önce araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını anlamanız çok önemlidir.

Araştırmaya katılım tamamen gönüllülük ilkesine bağlı olup katılmayı reddetmeniz herhangi bir cezaya ya da elde edilecek herhangi bir yararın kaybedilmesine kesinlikle yol açmayacaktır.

Aynı şekilde araştırmaya katılmayı kabul ettikten sonra da araştırmanın herhangi bir yerinde hiçbir neden göstermeksizin herhangi bir zarar ya da elde edilmesi beklenen bir yarar kaybına yol açmadan araştırmadan çekilebilirsiniz.

Araştırma kapsamında yapılan işlemlerin mali giderleri araştırmacılar ya da destekleyici (Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi-TÜBAP) tarafından karşılanacak olup size ya da sosyal güvenlik kurumunuza hiçbir mali yük getirmeyecektir.

Aşağıdaki bilgileri dikkatlice okuyun ve araştırmaya katılmak isteyip istemediğinize karar vermek için lütfen biraz düşünün.

- **Araştırmanın bilimsel adı:** Tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olan hastalarda *NLRP2, NLRP7* ve *KHDC3L* gen varyasyonları ilişkisinin araştırılması.
- **Araştırmanın anlaşılabilir basit adı:** Tekrarlayan gebelik kaybı olan hastalarda, kayıplara neden olan muhtemel genlerin araştırılması.
- **Sorumlu Araştırmacının adı ve görev yeri:** Doç. Dr. Hakan GÜRKAN Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı.
- **Araştırmanın amacı:** Çalışmamızda, Trakya Bölgesi'nde tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olan çiftlerin kadın eşlerinde *NLRP2, NLRP7 ve KHDC3L* genlerindeki olası varyasyonların araştırılması amaçlandı. Yapılacak olan tez çalışması sonucunda tekrarlayan gebelik kayıpları ile *NLRP2, NLRP7 ve KHDC3L* genleri arasında bir ilişkinin saptanması durumunda bu bilgi evrensel literatüre rapor edilecektir. Daha sonraki süreçte nedeni açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olan hastalarda ilişkili gen/genlerdeki varyasyonlar rutin olarak araştırılacaktır.
- **Araştırmanın niteliği (klinik, laboratuvar, epidemiyolojik, tez çalışması vb.):** Yüksek Lisans Tez Çalışması
- **Araştırmanın başlama tarihi ve öngörülen süresi:** Haziran 2018 – Haziran 2019
- **Araştırmaya katılması beklenen gönüllü sayısı:** Çalışmamıza Haziran 2018 – Haziran 2019 tarihleri arasında Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi polikliniğine tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü ile başvuran hastalar dahil edilecektir.
- **Araştırma sırasında uygulanacak olan invaziv yöntemler dahil olmak üzere gönüllüye uygulanacak yöntem, girişim ve tedavilerin tümü:** TGK öyküsü olan ve çalışmaya dahil edilme kriterlerine uygun olan hastalardan rutin tetkikler için EDTA'lı tüpe alınan periferik venöz kan örneklerinden 200 mikrolitre kullanılacaktır. Genomik DNA izolasyonu kullanılan kitin protokolüne uygun olarak yapılacaktır. DNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri Thermo NanoDrop 2000C cihazında ölçülecektir. Elde edilecek konsantrasyon yine kriterleri sağlamazsa tekrar kan alımı yapılacaktır.

Konsantrasyon ve saflık kontrolünden geçen DNA'lar çalışılmak üzere -20^{o}C 'de saklanacaktır.

- **Araştırmanın deneysel kısımları:** **Yeni nesil DNA dizi analizi çalışması:** Genetik değişikliklerin hastalıkların patogenezindeki rolünü aydınlatmada çok farklı teknik ve yaklaşımlar kullanılmaktadır. 1977'de ilk defa tanımlanan ve 2000'li yıllarda otomatize sistemlerle geliştirilen Sanger dizileme, ilgilenilen gende bulunan nokta mutasyonların ve küçük delesyon/insersiyonların belirlenmesinde altın standart olarak sıklıkla kullanılmaktadır. 2004 yılından itibaren hızla gelişen yeni nesil DNA dizi analizi (NGS) teknolojisi, Sanger sekanslamadan farklı olarak, bireye ait tüm genomun ya da çeşitli genlerden oluşan bir parçasının mutasyonlarını eşzamanlı ve düşük maliyetli olarak belirlenmesine olanak sağlayarak önemli bir boşluğu doldurmuştur. Çok genli kalıtımın söz konusu olduğu hastalıklarda geniş çaplı genetik taramaya olanak tanıyan yeni nesil sekanslama teknolojisi hastalığa yatkınlık yapabilecek bazı genetik değişikliklerin bir bütün olarak incelenebilmesine imkân sağlar (Güney Bademci, Mustafa Tekin Hastalıkların Moleküler Temeli ve Yeni Moleküler Testler, Turkiye Klinikleri J Pediatr Sci 2011;7(2):7-12).

  Yeni Nesil DNA Dizi analizinde birbirinden farklı platform ve yöntemler kullanılsa da temelde dört basamakta işlem gerçekleştirilmektedir:

  1. DNA izolasyonu
  2. Hedeflenen bölgenin çoğaltılarak kütüphane oluşturulması
  3. Yeni Nesil Dizi Analizi platfformlarından biri ile dizilerin okunması
  4. Verilerin biyoinformatik analizleri (bu kısım Next Generation Sequencing Technologies in Medical Genetics kitabından http://www.springer.com/us/book/9781461490319)

  Planlanan çalışmada *NLRP2, NLRP7 ve KHDC3L* genlerindeki olası varyasyonların araştırılması amacı ile gen her bir olgunun eşzamanlı olarak dizilenebilmesi için masif paralel sekanslama yönteminden faydalanılacaktır. Bunun için çalışmaya dahil edilecek olgulardan alınan periferik venöz kan örneklerinden, Qiagen EZ1 Advanced protokolüne uygun olarak genomik DNA izole edilecektir. Hedeflenen gen bölgeleri hızlı hedef zenginleştirme protokolüne uygun olarak çoğaltılan kütüphaneler, Yeni Nesil DNA Dizi Analizi metodu ile masif olarak çoğaltılıp floresan ışımalarına bağlı olarak yüksek derinlikte dizilenecektir. Yeni Nesil DNA Dizi analizi verilerinin güvenilirliği için, her bir gen bölgesi en az 100X derinlikte dizilenecek, olası splice bölge varyasyonlarının ve ekzona yakın genetik değişikliklerin belirlenebilmesi için de ekzon başlangıç ve son kısımlarından en az 50 baz dizinin okunabilmesi için uygun olan primerler (sentetik oligonükleotidler) ve problar kullanılacaktır.

Verilerin biyoinformatik analizinde üretici firmanın önerdiği analiz programları kullanılacak, bulunan varyantların görsel olarak değerlendirilmesinde Broad Institute tarafından geliştirilen IGV (Integrative genomics Viewer) programının en güncel versiyonundan faydalanılacaktır.

- **Farklı uygulama ve girişimler için gönüllülerin araştırma gruplarına rastgele atanma olasılığı:** Belirtilen uygulama dışında farklı bir yöntem uygulanmayacağı için gönüllülerin araştırma gruplarına rastgele atanma olasılığı yoktur.
- **Araştırmadan doğrudan gönüllü için beklenen yarar:** Tekrarlayan gebelik kayıplarında olası nedenin genetik olarak saptanması.
- **Gönüllünün sorumlulukları:** Gönüllünün, gönüllülük esasına dayalı olarak tetkikleri yapıldıktan sonra artan kandan kullanılmasına izin vereceği kan örneğinden başka çalışmaya karşı bir sorumluluğu bulunmamaktadır.
- **Gönüllünün (araştırma hamilelerde veya lohusalarda yapılacaksa ise embriyo, fetüs veya süt çocuklarının da) maruz kalabilecekleri riskler veya rahatsızlıklar:** Gönüllülere doğrudan girişimsel bir işlem yapılmayacaktır. Rutin tetkikler amacı ile alınan ve tetkikleri yapıldıktan sonra artan periferik venöz kan örneğinden 200 µl alınarak hastaya ait genetik materyal elde edilecektir.
- **Risklere karşı alınan önlemler:** Çalışmaya dahil olan kişilerde periferik kan alınırken enjektör iğnesinin battığı noktada duyulabilecek olan ağrı hissi, kan alınan bölgedeki doku hassasiyetine bağlı olarak gelişebilecek ekimoz olası risklerdir. Olası ekimoz gelişmini en aza indirgemek için kan alınan bölgeye pamukla tampon uygulaması (en az 5 dakika) önerilecektir.
- **Gönüllüye alternatif olarak uygulanabilecek olan diğer yöntemler ve bunların olası yarar ve zararları:** Gönüllüye alternatif olarak başka bir yöntem uygulanmayacaktır.
- **Araştırmaya bağlı olarak bir zarar oluştuğunda verilecek tazminat ve sağlanacak tedaviler:** Kan örneği için ekstra bir girişim uygulanmayacaktır. Bu nedenle araştırmaya bağlı herhangi bir zarar beklenmemektedir.
- **Gönüllülere yapılacak ulaşım, yemek gibi masraflara ilişkin ödemeler:** Yapılacak olan çalışma gönüllülük esasına göre yapılacak olup, gönüllülere herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

- **Gönüllünün araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek durumlar veya nedenler:** Hastalar kendi istekleri ile çalışmadan ayrılabilirler.
- **Araştırma sonunda gönüllülere bilgi verilecek mi?:** Gerekli olması durumunda araştırma sonunda gönüllülere bilgi verilecektir.
- **Gönüllülerin araştırma hakkında, kendileri hakkında ya da araştırmayla ilgili herhangi bir beklenmedik olay hakkında daha fazla bilgi edinebilmesi için temasa geçebileceği kişi ve kendisine günün 24 saatinde erişebileceği telefon numarası: +90 536 845 6483**
- **Gönüllülerden elde edilecek olan biyolojik materyallerin hangi amaçlarla kullanılacağı:** Gönüllülerden elde edilecek biyolojik materyal (periferik venöz kan) yapılması planlanan araştırma kapsamında kullanılacaktır.
- **Gönüllülerden elde edilecek biyolojik materyaller üzerinde genetik araştırma yapılabilmesi için onay:**

  "Tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olan hastalarda *NLRP2, NLRP7* ve *KHDC3L* gen varyasyonları ilişkisinin araştırılması**" araştırması kapsamında alınan biyolojik örneklerimin (kan, idrar, vb…);**

  ☐ **Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.**

  ☐ **İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.**

  ☐ **Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.**

EK-2

ETİK KURUL ONAY FORMU

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-BAEK 2018/172	
	PROTOKOL ADI	Tekrarlayan Gebelik Kaybı Öyküsü Olan Hastalarda NLRP2, NLRP7 ve KHDC3L Gen Varyasyonları İlişkisinin Araştırılması	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Doç. Dr. Hakan GÜRKAN	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası
KARAR BİLGİLERİ	**Karar No: 08/06**	**Tarih:07.05.2018**	
	Fakültemiz Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Hakan GÜRKAN'ın sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans Öğrencisi Netzat MOUSTAFA'nın tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş; araştırmaya ilişkin giderlerin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda ve veri toplanacak yerlerden gerekli izinler alındıktan sonra gerçekleştirilmesinde etik bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ			
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-BAEK Yönergesi		

ÜYELER

Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E (H)	(E) H	
Doç. Dr. Rugül KÖSE ÇINAR Başkan Yardımcısı	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağ. ve Has. A.D.	K	E (H)	(E) H	
Dr. Öğr.Üyesi Ruhan Deniz TOPUZ Üye	Tıbbi Farmakoloji.	T.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D	K	E H	E H	Mazeretli
Dr. Öğr. Üyesi F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. BiyoistatistikA.D.	K	E (H)	(E) H	
Doç. Dr. Hakan GÜRKAN Üye	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	(E) H	E (H)	
Prof. Dr. Hasan ÜMİT Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	**E H**	**E H**	Mazeretli
Dr. Öğr. Üyesi Oktay KAYA Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	E	E (H)	(E) H	
Doç. Dr. Cafer Sadık ZORKUN Üye	Kardiyoloji	T.Ü.T.F. Kardiyoloji A.D.	E	E (H)	(E) H	
Prof. Dr. Muzaffer ESKİOCAK Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	E	E H	E H	Mazeretli
Prof. Dr. Niyazi Cenk SAYIN Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E H	E H	Mazeretli
Prof. Dr. Sevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN Üye	Anestezi ve Reanimasyon	T.Ü.T.F. Anestezi ve Reanimasyon A.D.	K	E (H)	(E) H	
Prof. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E H	E H	Mazeretli
Avukat Özden İPÇİ Üye		T.Ü. Rektörlüğü	E	E H	E H	Mazeretli
Emekli Öğretmen Sinan SEÇKİN Üye		Serbest Üye	E	E H	E H	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Ahmet TEZEL
Dekan a.
Dekan Yrd.